



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE  
PERNAMBUCO**

*PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO*



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

## **Tese de Doutorado**

**Caracterização polifásica de isolados de *Burkholderia* spp.  
causadores de podridão bacteriana das escamas no Brasil**

**Fernanda Larisse dos Santos Lima**

**Recife – PE**

**2024**

**FERNANDA LARISSE DOS SANTOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Burkholderia* spp.  
CAUSADORES DE PODRIDÃO BACTERIANA DAS ESCAMAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva

**RECIFE - PE  
SETEMBRO - 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo – CRB-4 1781

L732c Lima, Fernanda Larisse dos Santos.  
Caracterização polifásica de isolados de  
*Burkholderia* spp. causadores de podridão  
bacteriana das escamas no Brasil / Fernanda Larisse  
dos Santos Lima. – Recife, 2024.  
72 f.; il.

Orientador(a): Marco Aurélio Siqueira da Gama.  
Co-orientador(a): Elineide Barbosa de Souza.  
Co-orientador(a): Adriano Márcio Freire Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural  
de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Bactérias patogênicas. 2. Cebola - Doenças e  
pragas. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. I.  
Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Souza,  
Elineide Barbosa de, coorient. III. Silva, Adriano  
Márcio Freire, coorient. IV. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Burkholderia* spp.  
CAUSADORES DE PODRIDÃO BACTERIANA DAS ESCAMAS NO BRASIL**

**FERNANDA LARISSE DOS SANTOS LIMA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30/09/2024

**ORIENTADOR(A):**

Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

**EXAMINADORES:**

Dr. Adriano Marcio Freire Silva

Dr. André Ângelo Medeiros Gomes

Dr. Hailson Alves Ferreira Preston

Dr. Willams José de Oliveira

**RECIFE - PE  
SETEMBRO - 2024**

*A todos aqueles que, assim como eu, não desistiram diante dos obstáculos, mantiveram a esperança viva nos momentos mais difíceis e encontraram forças para seguir em frente quando o caminho parecia impossível, transformando desafios em aprendizado e superação.*

## **OFEREÇO**

*Aos meus pais, **Lucineide Esmerino dos Santos e Fernando de Barros Lima**, aos meus irmãos, **Luís Alberto dos Santos Lima e Irene Vitória dos Santos Lima**, e a minha avó, **Luzinete Lopes dos Santos**, pelo apoio incondicional, pelos sacrifícios silenciosos e amor inabalável. Por sempre acreditarem em mim e me ensinarem com cada gesto, o significado de generosidade, força e coragem.*

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e sabedoria para enfrentar esta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, a quem carinhosamente considero meu pai científico, por toda a confiança depositada em mim, por todos os conselhos, apoio e incentivo, sendo uma fonte constante de sabedoria e profissionalismo.

Aos meus coorientadores, Prof<sup>a</sup>. Dra. Elineide Barbosa de Souza e Dr. Adriano Márcio Freire, por todo o apoio e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

Aos pesquisadores Nadson Pontes, Renata Resende e Ailton Reis, por terem me enviado isolados para a execução da pesquisa e por todo suporte o oferecido, além do professor José Belasque, que me recebeu em seu laboratório na ESALQ.

Aos produtores das cidades de Monte Alto e São José do Rio Pardo (SP), especialmente ao senhor Aparício, Renato, Tiago Boer, José Terron, seu Zé, Santo Vedoveli e Vitor Aidar por terem me recebido em suas propriedades e por toda a troca de conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Fitobacteriologia, Fernanda Corona, Lucas Lucena, Lucas Amâncio, Lucas Nascimento, Leandro Velez, Greecy Mirian, Igor Pimentel, Rodrigo Pimentel, David Ferreira, Ruth Kaen, Ezechiel Jean, Walter Carneiro, e especialmente a Keyla Walescka e Maria Clara, por todas as madrugadas ao som de forró das antigas, as conversas com sabor de açaí e combos de cafeteria, por todas as vezes em que rimos juntas e tantas outras que secaram as minhas lágrimas, além da colaboração nos experimentos.

A minha amiga Lauizy Andrade, que me acolheu como uma irmã em sua casa na etapa das coletas e escutou atentamente sobre a minha paixão por doramas. E também ao Thiago, que comprou as nossas aventuras e ainda foi o nosso motorista particular para as fazendas.

Ao meu namorado, Paulo Roberto Beserra Diniz, por ter acreditado nos meus sonhos e me dado asas para voar, ainda que isso tenha lhe custado quatro anos da mais árdua saudade.

A minha cunhada, Paula Rejane, seu marido Michel e meu sobrinho Miguel, por terem sido a minha rede de apoio em Recife e terem tornado a minha jornada mais feliz.

A minha família, especialmente aos meus pais Lucineide e Fernando, aos meus irmãos Luís Alberto e Vitória e a minha avó Luzinete. Vocês sempre serão o meu “por quem”.

A UFRPE, pela oportunidade de me tornar a profissional que sou hoje.

A CAPES, FACEPE e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

## SUMÁRIO

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO GERAL .....                                                           | 8  |
| GENERAL ABSTRACT.....                                                        | 9  |
| CAPÍTULO I.....                                                              | 10 |
| INTRODUÇÃO GERAL.....                                                        | 11 |
| 1. A cultura da cebola: aspectos culturais e econômicos .....                | 11 |
| 2. Podridão bacteriana das escamas .....                                     | 13 |
| 3. Características do gênero <i>Burkholderia</i> .....                       | 15 |
| 4. O complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....                              | 17 |
| 5. Técnicas moleculares utilizadas para caracterização de fitobactérias..... | 19 |
| 5.1. Sequenciamento da região 16S rRNA.....                                  | 19 |
| 5.2. rep-PCR .....                                                           | 20 |
| 5.3. Sequenciamento do gene <i>recA</i> .....                                | 21 |
| 6. Caracterização patológica .....                                           | 21 |
| 7. Formação de biofilme.....                                                 | 22 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                             | 23 |
| CAPÍTULO III.....                                                            | 29 |
| Resumo .....                                                                 | 30 |
| Abstract.....                                                                | 31 |
| Material e métodos .....                                                     | 32 |
| Isolados bacterianos, condições de cultivo e testes de patogenicidade .....  | 32 |
| Caracterização patológica.....                                               | 33 |
| Caracterização molecular .....                                               | 34 |
| Extração de DNA genômico.....                                                | 34 |
| BOX-PCR.....                                                                 | 34 |
| Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA.....                        | 34 |
| Análise do gene <i>recA</i> .....                                            | 35 |
| Análises filogenéticas .....                                                 | 35 |
| Resultados.....                                                              | 36 |
| Isolados bacterianos e testes de patogenicidade .....                        | 36 |
| Caracterização patológica.....                                               | 36 |
| BOX-PCR.....                                                                 | 37 |
| Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA.....                        | 37 |
| Gene <i>recA</i> .....                                                       | 37 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Discussão .....                                                              | 38 |
| Referências bibliográficas .....                                             | 39 |
| CAPÍTULO III.....                                                            | 51 |
| Resumo .....                                                                 | 52 |
| Abstract.....                                                                | 53 |
| Material e métodos .....                                                     | 55 |
| Isolados bacterianos, condições de crescimento e preparação do inóculo ..... | 55 |
| Formação de biofilme <i>in vitro</i> .....                                   | 56 |
| Formação de biofilme <i>in vivo</i> .....                                    | 57 |
| Motilidade <i>swarming</i> .....                                             | 58 |
| Análises estatísticas .....                                                  | 58 |
| Resultados.....                                                              | 58 |
| Formação de biofilme <i>in vitro</i> .....                                   | 58 |
| Formação de biofilme <i>in vivo</i> .....                                    | 59 |
| Motilidade <i>swarming</i> .....                                             | 60 |
| Discussão .....                                                              | 61 |
| Referências bibliográficas .....                                             | 63 |
| CONCLUSÕES GERAIS .....                                                      | 72 |

## RESUMO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) é a espécie mais importante em termos de volume de produção e valor econômico dentro do gênero *Allium* e ocupa o terceiro lugar dentre as hortaliças em importância econômica no Brasil e no mundo. No entanto, a cultura é suscetível a diversas doenças, entre as quais se destaca a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). A caracterização dos patógenos relacionados à doença é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: i) analisar a diversidade de *Burkholderia* spp. causadoras de podridão bacteriana das escamas nas principais regiões produtoras do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e ii) analisar e caracterizar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* em tecidos de cebola de isolados fitopatogênicos de *B. sola* e *B. semiarida* e a sua motilidade swarming. Para tal, foi realizada uma abordagem polifásica, que incluiu a coleta de isolados a partir de bulbos de cebola com sintomas típicos da doença, seguida de genotipagem por meio do marcador BOX-PCR, análise filogenética com base na região 16S rDNA e no gene *recA*, e caracterização patológica. Além disso, foi analisada a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* de isolados de *B. sola* e *B. semiarida*, duas espécies recém descritas. A genotipagem separou os isolados em 62 haplótipos e 51 grupos distintos, sendo identificadas espécies como *B. orbicola*, *B. remitis* e *B. ambifaria*, além de um isolado que não se agrupou com espécies conhecidas, sugerindo a possível existência de uma nova espécie. A caracterização patológica revelou variabilidade na agressividade da doença entre os isolados. *B. sola* e *B. semiarida* formaram biofilmes em diferentes níveis. A formação de biofilme foi observada no parênquima e nas paredes celulares de catafilos de cebola, que foram degradadas pela ação do patógeno. As análises por microscopia eletrônica evidenciaram diferenças morfológicas nos biofilmes formados pelos isolados. Também foi identificada uma relação inversa entre a formação de biofilme e a motilidade swarming de alguns isolados estudados, sugerindo que essas características desempenham papéis complementares na colonização e patogenicidade em cebola. Esses resultados contribuem para o entendimento do comportamento patogênico de *Burkholderia* spp. e podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle da podridão bacteriana das escamas.

**Palavras-chaves:** complexo *B. cepacia*; *Allium cepa*; BOX-PCR; *recA*; motilidade swarming.

## GENERAL ABSTRACT

Onion (*Allium cepa* L.) is the most important species in terms of production volume and economic value within the *Allium* genus, ranking third among the most economically significant vegetables in Brazil and worldwide. However, this crop is susceptible to various diseases, among which sour skin, caused by species of the *Burkholderia cepacia* complex (BCC), stands out. Characterizing the pathogens related to the disease is essential for developing effective management strategies. Therefore, the objectives of this study were: i) to analyze the diversity of *Burkholderia* spp. causing sour skin in the main onion-producing regions of Southern, Southeastern, and Central-West Brazil, and ii) to analyze and characterize the biofilm formation capacity in vitro and in vivo in onion tissues of pathogenic isolates of *B. sola* and *B. semiarida*, as well as their swarming motility. A polyphasic approach was used, including the collection of isolates from onion bulbs showing typical symptoms of the disease, followed by genotyping using the BOX-PCR marker, phylogenetic analysis based on the 16S rDNA region and the *recA* gene, and pathological characterization. Additionally, the biofilm formation capacity in vitro and in vivo of *B. sola* and *B. semiarida*, two newly described species, was analyzed. Genotyping separated the isolates into 62 haplotypes and 51 distinct groups, identifying species such as *B. orbicola*, *B. remitis*, and *B. ambifaria*, as well as an isolate that did not cluster with known species, suggesting the possible existence of a new species. The pathological characterization revealed variability in disease aggressiveness among the isolates. *B. sola* and *B. semiarida* formed biofilms at different levels. Biofilm formation was observed in the parenchyma and cell walls of onion scales, which were degraded by the pathogen. Electron microscopy analyses highlighted morphological differences in the biofilms formed by the isolates. An inverse relationship between biofilm formation and swarming motility was also identified of some isolates studied, suggesting that these characteristics play complementary roles in colonization and pathogenicity in onions. These findings contribute to a better understanding of the pathogenic behavior of *Burkholderia* spp. and may aid in developing more effective strategies for controlling sour skin.

**Keywords:** *B. cepacia* complex; *Allium cepa*; BOX-PCR; *recA*; swarming motility.

## CAPÍTULO I

### Introdução Geral

## CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Burkholderia* spp. CAUSADORES DE PODRIDÃO DE ESCAMAS NO BRASIL

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1. A cultura da cebola: aspectos culturais e econômicos

O gênero *Allium* está disposto taxonomicamente na classe Monocotyledones, ordem Asparagales, família Alliaceae e abrange espécies de importância econômica como a cebola (*Allium cepa* L.), o alho (*A. sativum* L.), o alho porró (*A. ampeloprasum* L. var. *porrum* (L.) J. Gay), a cebolinha (*A. fistulosum* L.), entre outras (Kiill; Resende; Souza, 2007). Nesse contexto, a cebola é a espécie mais importante em termos de volume de produção e valor econômico dentro do gênero (EPAGRI, 2013) e ocupa o terceiro lugar dentre as hortaliças em importância econômica no Brasil e no mundo (Menezes Júnior; Kurtz, 2016), após o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e a batata (*Solanum tuberosum* L.) (Marcuzzo et al., 2018).

A importância social e econômica da cebolicultura no Brasil pode ser avaliada pela geração de emprego e renda fixa, beneficiando mais de 60 mil famílias no país (EPAGRI, 2013). No ano de 2022, a produção mundial de cebola foi superior a 110 milhões de toneladas (FAO, 2024), ao passo em que, no mesmo ano, o Brasil obteve uma produção de 1.656.076 toneladas (IBGE, 2024), destacando-se como maiores produtores as regiões Sul (745.309 t) e Sudeste (405.499 t), seguidas pelo Nordeste (342.191 t) e Centro-Oeste (159.177). O estado de Santa Catarina lidera a produção, com 492.740 toneladas (IBGE, 2024).

A oferta de cebola no Brasil é relativamente satisfatória ao longo do ano, graças às cultivares adaptadas a diferentes ambientes (Boeing, 2002). No entanto, a produção ainda sofre oscilações sazonais e anuais, alternando entre períodos de excesso e escassez, principalmente devido a fatores climáticos. Durante os períodos de escassez, são realizadas importações, principalmente da Argentina (Boeing, 2002). Muitas vezes, a cebola importada supera a demanda, resultando na queda dos preços da cebola brasileira, que frequentemente apresenta menor padronização comercial e visual em comparação com a cebola importada (Santos; Oliveira; Leite, 2013).

Existem incertezas quanto ao centro de origem da cebola, devido a ausência de espécies selvagens da cultura. No entanto, a maioria dos botânicos aponta a Ásia Central, incluindo o Noroeste da Índia, Afeganistão, Tadjiquistão, Uzbequistão e parte de Tian-chan, como o provável local de origem. Outras regiões consideradas possíveis centros secundários são o Oriente Próximo e áreas ao redor do Mar Mediterrâneo (Kiill; Resende; Souza, 2007).

Morfologicamente, a cebola é descrita como uma planta herbácea, cujo bulbo tunicado é considerado a parte comercial, apresentando variações quanto a cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (Kiill; Resende; Souza, 2007). Outros aspectos, como peso, formato, firmeza e sólidos solúveis do bulbo são essenciais para determinar a qualidade da cebola e a sua variabilidade (Mallor et al., 2011). A planta atinge aproximadamente 60 cm de altura e apresenta folhas tubulares e cerosas, enquanto suas flores reúnem-se em uma inflorescência tipo umbela simples, na ponta do escapo floral (Filgueira, 2008).

O crescimento vegetativo da cebola pode ser favorecido por temperaturas mais baixas (10-15°C) e fotoperíodo curto (Sonawane et al., 2022), ao passo em que o desenvolvimento do bulbo varia de acordo com a variedade. Cebolas de dias curtos requerem fotoperíodos de 10-12 horas, cebolas de dias intermediários necessitam de 12-14 horas, e cebolas de dias longos precisam de 14-16 horas de fotoperíodo (Bachie; Santiago; McGiffen, 2019). Em geral, o desenvolvimento do bulbo é estimulado por temperaturas mais altas (20-30°C) e pelo fotoperíodo adequado à variedade (Sonawane et al., 2022).

Na cebolicultura, a escolha do genótipo é principalmente influenciada pelo fotoperíodo e temperatura específicos para cada cultivar e região produtora, requisitos essenciais para o processo de bulbificação. As práticas de manejo visam criar condições que permitam ao genótipo escolhido atingir seu máximo potencial, resultando em características produtivas que atendam às exigências do mercado e proporcionem rentabilidade ao agricultor. Além disso, o ciclo da cultura pode ser influenciado pelo aumento da população de plantas, que pode acelerar ou retardar a maturação dos bulbos, dependendo da cultivar utilizada (Menezes-Júnior; Neto, 2012).

A cebola é considerada amplamente versátil para a alimentação humana, podendo ser consumida tanto crua quanto cozida. Devido a características como sabor, pungência, aroma e propriedades terapêuticas, a maior parte do seu consumo é realizado de forma *in natura*, sendo também utilizada para condimentos e temperos (Kunz et al., 2009). O consumo de cebola é reconhecido desde a antiguidade, conforme evidencia o livro de receitas mais antigo do mundo, uma tábua de argila com mais de 4000 anos, que apresenta o uso de cebola e alho-poró como aromatizantes, ressaltando sua importância. Além de agregar sabor, pungência e aroma aos pratos, a cebola é valorizada por suas propriedades funcionais e terapêuticas, derivadas da presença de compostos bioativos como flavonoides, antocianinas e compostos organossulfurados (Khosa et al., 2016).

O cultivo da cebola pode ser realizado a partir de sementes plantadas diretamente no campo ou por meio de bulbinhos, que são pequenos bulbos utilizados na propagação

vegetativa. No entanto, a propagação vegetativa pode resultarem problemas adicionais para o manejo de doenças, uma vez que o plantio de materiais infectados pode favorecer a disseminação de patógenos (McDonald; Jaime; Hovius, 2004). Além disso, a associação entre escamas e folhas do bulbo desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças da cebola acarretadas por bactérias, uma vez que infecções que iniciam nas folhas podem migrar até o bulbo (McDonald; Jaime; Hovius, 2004).

Diversas doenças podem incidir sobre a cebolicultura, podendo ser de origem fúngica, viroses, nematoses e bacterioses. Dentre as doenças bacterianas, destaca-se a podridão das escamas como uma doença de ocorrência generalizada, que pode trazer perdas de até 50% na comercialização dos bulbos de cebola (Wordell-Filho; Boff, 2006). O termo podridão das escamas é um termo generalista atribuído a um conjunto de podridões causadas por diferentes bactérias (Silva et al., 2018), como *B. cenocepacia* (Oliveira et al., 2017), *B. cepacia* (Palleroni; Holmes, 1981), *B. gladioli* pv. *alliicola* (Young et al., 1996), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (Wordell-Filho; Boff, 2006) e *Serratia marcescens* (Marques, 1994). Assim, a sintomatologia e a nomenclatura da doença variam de acordo com a bactéria envolvida (Silva et al., 2018). Quando a podridão é causada por *B. gladioli* pv. *alliicola*, a doença é conhecida como podridão escorregadia, uma vez que ocorre nas escamas mais internas ou no centro do bulbo, que ficam amolecidos e exalam um odor sulfuroso. Quando causada por *Pseudomonas aeruginosa*, a doença é chamada de escurecimento interno do bulbo, caracterizada por uma podridão escura no centro do bulbo, sem amolecimento e que não atinge as escamas adjacentes (Wordell-Filho; Boff, 2006). *Serratia marcescens*, por sua vez, tem sido associada à podridão do pescoço e à maceração das escamas externas em bulbinhos destinados ao cultivo no estado de São Paulo (Marques, 1994; Wordell-Filho; Boff, 2006). Adicionalmente, quando a podridão é causada por bactérias do complexo *B. cepacia* (CBC), a doença é denominada camisa d'água ou podridão bacteriana das escamas, pois compromete principalmente as camadas externas dos bulbos, enquanto as camadas internas permanecem intactas (Wordell-Filho; Boff, 2006).

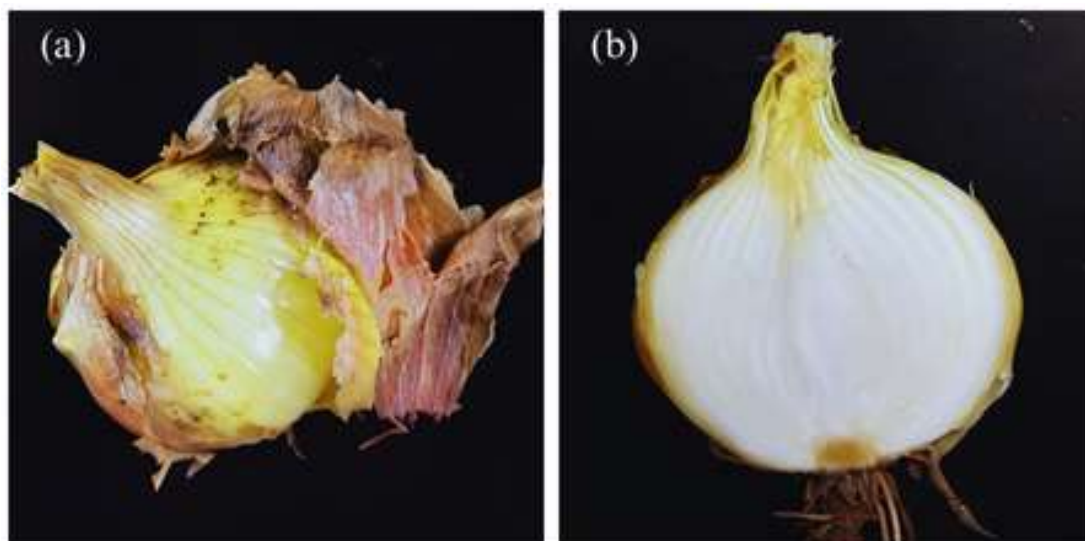
## **2. Podridão bacteriana das escamas**

O primeiro relato da podridão bacteriana das escamas no mundo foi realizado por Burkholder (1950), que observou a doença em campos de produção de cebola em Nova York, Estados Unidos. Na ocasião, a doença recebeu o nome de “sour skin”, devido ao seu característico odor avinagrado. Inicialmente, o agente etiológico da doença foi classificado como *Pseudomonas cepacia* (Burkholder, 1950), devido a sua semelhança com outras

espécies do gênero (Eissa, 2024). No entanto, em meados dos anos 90, o patógeno foi reclassificado como *B. cepacia* (Yabuuchi et al., 1992).

A podridão bacteriana das escamas pode causar perdas significativas para a cebolicultura (Wordell-Filho; Boff, 2006). Nesse contexto, estudo realizado em Santa Catarina nos anos de 2014 e 2015, identificou a podridão bacteriana das escamas causada por *B. cepacia* como uma das principais doenças em cebolas armazenadas. A incidência dessa doença apresentou uma taxa de 50,7% em 2014 e 45,3% em 2015, o que destacou a relevância do patógeno nesse ambiente (Marconatto; Koehler; Marcuzzo, 2017).

Os sintomas da podridão bacteriana das escamas incluem um odor avinagrado característico e afeta principalmente as escamas mais externas dos bulbos de cebola, deixando-os com uma aparência úmida e coloração amarelada, decorrente de substâncias produzidas pelo bulbo em resposta à presença da bactéria (Figura 1). Cebolas infectadas podem apresentar enrugamento da porção superior do bulbo, e, em estágios avançados, a película externa solta facilmente com o toque durante o manuseio, enquanto a porção interna à camada afetada permanece firme, resultando geralmente na formação de uma película que se desprende ao toque e origina bulbos brancos (Wordell-Filho; Stadnik, 2007).



**Figura 1:** Bulbo de cebola apresentando sintomas de podridão de escamas. (a) Visão externa mostrando a degradação das camadas superficiais. (b) Corte longitudinal revelando os sintomas internos da doença nos catafilos externos e o interior praticamente intacto.

A colonização pode ocorrer no campo, após a formação dos bulbos, através da disseminação da bactéria pela água ou solo, ou ainda durante o armazenamento. No entanto, o mais comum é que a infecção ocorra no campo, após a formação do bulbo, um pouco antes da

colheita, onde o patógeno presente no solo penetra o tecido do bulbo por meio de ferimentos ocasionados pela remoção dos topos na colheita, ou é levado das folhas para as escamas do bulbo (Parke; Gurian-Sherman, 2001). Para o manejo da doença, de forma geral recomenda-se utilizar bulbos e sementes sadias, bem como evitar a umidade excessiva do solo, utilizar implementos agrícolas desinfestados, realizar rotação de culturas com outras famílias botânicas, evitar ferimentos nas plantas durante os tratos culturais, controlar insetos, descartar bulbos infectados, realizar a colheita dos bulbos apenas no estágio correto de maturação e armazenar os bulbos em baixas condições de temperatura, umidade do ar e em locais aerados (Peixoto et al., 2016).

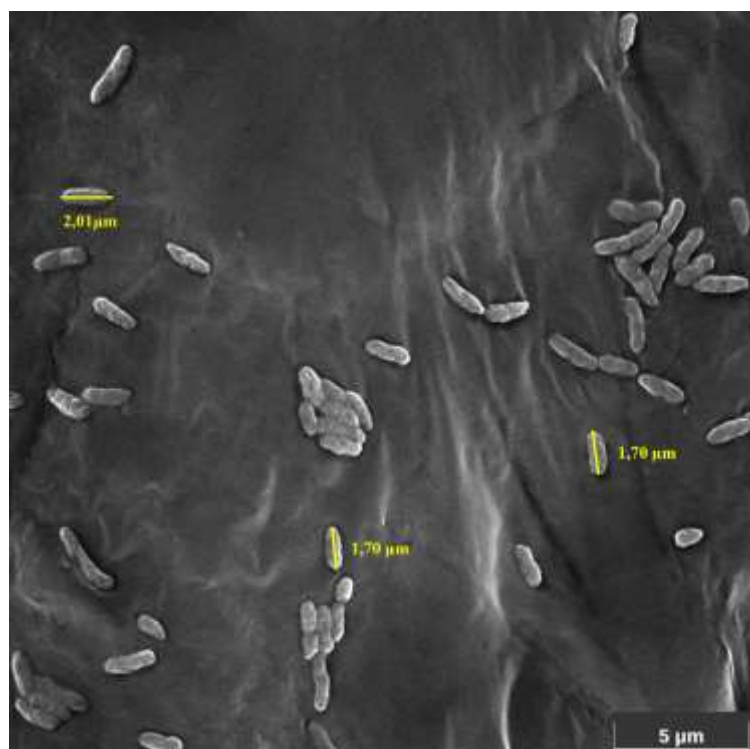
No Brasil, a doença já foi oficialmente relatada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro (Malavolta Jr. et al., 2008), Bahia e Pernambuco (Oliveira et al., 2019). Recentemente, foi demonstrada a predominância da podridão bacteriana das escamas nas principais áreas de produção de cebola do Nordeste brasileiro, sendo *B. cenocepacia* e *B. orbicola* as principais espécies observadas (Baia et al., 2021). Além disso, duas novas espécies, *B. sola* e *B. semiarida*, foram identificadas associadas à doença na região (Velez et al., 2023), o que sugere que possam existir outras espécies ainda não identificadas nas demais regiões produtoras de cebola no país.

### 3. Características do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* é classificado no filo *Pseudomonadota*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae* (Kado, 2010). Este gênero compreende espécies que habitam os mais diversos nichos ecológicos, incluindo solos, ambientes hospitalares e plantas. Suas espécies são Gram-negativas, em formato de bastonetes retos ou curvos (1,0-5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura) (Figura 2), possuem um ou vários flagelos polares, são aeróbios, apresentam reação de oxidase e catalase positiva e não esporulam (Silva et al., 2018). Desde a sua descoberta, a classificação taxonômica das espécies de *Burkholderia* têm sofrido mudanças e o aumento do interesse por essas bactérias tem levado à descrição de novas espécies (Silva et al., 2018).

As espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* são capazes de se adaptar a diferentes fontes de nutrientes e utilizam uma ampla variedade de carboidratos como fonte de carbono. A maioria dessas espécies é considerada mesófila, com temperatura ideal de crescimento entre 30°C e 37°C, embora algumas possam crescer a 42°C (Silva et al., 2018). (Coenye; Vandamme, 2003). Essas bactérias possuem alta diversidade genética e podem trocar genes com outras bactérias por meio de transferência horizontal. Também podem

formar biofilmes e resistir a muitos agentes antimicrobianos (Eissa, 2024).



**Figura 2:** Micrografia eletrônica de varredura mostrando células de *B. semiarida*, com ampliação de 10.000x, onde é possível observar o tamanho médio e a morfologia do patógeno.

As espécies do gênero *Burkholderia* possuem uma dualidade complexa, apresentando tanto aspectos benéficos quanto prejudiciais. Algumas espécies atuam como patógenos de plantas, comprometendo a produtividade agrícola e desafiando o manejo das culturas. Além disso, podem ser patógenos oportunistas em humanos, especialmente para indivíduos imunocomprometidos. Por outro lado, algumas espécies favorecem o crescimento das plantas ao fixar nitrogênio e solubilizar fósforo, o que contribui para práticas agrícolas sustentáveis. Além disso, outras espécies, a exemplo de *B. fungorum*, são resistentes a metais pesados e eficazes na biorremediação de solos contaminados (Eissa, 2024).

Muitas espécies de *Burkholderia* formam associações estreitas com plantas, variando desde endofíticas até simbioses obrigatórias. Nesse sentido, *B. phytofirmans*, protege as plantas contra patógenos e melhora a resistência a condições adversas, como estresse hídrico e salino, (Bournaud et al., 2013), enquanto *B. phenoliruptrix* apresenta capacidade de nodulação em leguminosas e exercem simbiose obrigatória com plantas (Eberl; Vandamme, 2016). A diversidade genética do gênero também possibilita a produção de bioprodutos valiosos, como enzimas, com diversas aplicações industriais. Entretanto, a presença de *Burkholderia* em

ambientes agrícolas e clínicos exige um gerenciamento cuidadoso para evitar possíveis riscos e garantir que os benefícios sejam plenamente aproveitados (Eissa, 2024). Portanto, o conhecimento da diversidade de espécies de *Burkholderia* no agroecossistema da cebolicultura pode ajudar a reduzir os danos provocados pela podridão bacteriana das escamas e ajudar a potencializar os efeitos benéficos das espécies presentes naturalmente nesse ambiente.

#### 4. O complexo *Burkholderia cepacia*

Em meados dos anos 90, o gênero *Burkholderia* foi proposto para acomodar espécies de *Pseudomonas* que compunham o grupo II de homologia rRNA-DNA (Yabuuchi et al., 1992). As sete primeiras espécies de *Burkholderia* descritas foram *B. cepacia* (ex. *P. cepacia*), *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. picketti* e *B. solanacearum* (Yabuuchi et al., 1992), com as duas últimas espécies sendo, em seguida, transferidas para o gênero *Ralstonia* (Yabuuchi et al., 1995). Nessa época, as técnicas disponíveis para estudos taxonômicos eram pouco sensíveis, o que resultou na classificação equivocada de isolados de diferentes espécies intimamente relacionadas como *B. cepacia*. A elevada diversidade genética entre os isolados classificados nessa espécie foi observada por Vandamme et al., (1997), que demonstraram, por meio de técnicas moleculares, que isolados oriundos de diferentes ambientes pertenciam a pelo menos a cinco genomovares. Este grupo de genomovares passou a ser coletivamente referido como complexo *B. cepacia* (CBC) (Silva et al., 2018). Adicionalmente, esse período também marcou o reconhecimento de isolados do CBC como patógenos humanos (Eissa, 2024).

Com o passar do tempo, diversas espécies foram inseridas no CBC, e atualmente ele é composto por um grupo versátil de 26 espécies intimamente relacionadas, encontradas em variados ambientes ao redor do mundo, como água de rios, solo, plantas, ambientes hospitalares e humanos (Martina et al., 2018). As espécies do complexo *B. cepacia* apresentam alta similaridade entre as sequências da região 16S rDNA (98-100%) e do gene *recA* (94-95%), moderados níveis de hibridização DNA-DNA (30-50%) (Coenye et al., 2001) e valores de identidade média de nucleotídeo (Average Nucleotide Identity - ANI) abaixo de 90% (85,04 a 89,92%) (Peeters et al., 2013; Vanlaere et al., 2009). O número de cromossomos e o tamanho do genoma podem variar entre isolados de uma mesma espécie, o que contribui para a sua diversidade genética (Silva et al., 2018), com genomas completos variando entre 6 Mb e 9 Mb (Mahenthiralingam; Baldwin; Dowson, 2008), aproximadamente três vezes maior do que o genoma de *Escherichia coli* (Parke; Gurian-Sherman, 2001). Adicionalmente o genoma é rico em sequências de inserção e elementos genéticos móveis, o

que contribui para a plasticidade e diversidade genética, resultando em perfis bioquímicos variáveis entre isolados pertencentes a uma mesma espécie (Mahenthiralingam; Baldwin; Dowson, 2008).

Os membros do CBC despertam interesse biotecnológico devido ao seu potencial como agentes de controle biológico de plantas, biorremediação e promoção do crescimento vegetal (Perin; Araújo; Reis, 2006). Esses isolados têm sido explorados para fins agrícolas, o que tem gerado um crescente interesse no uso dessas bactérias na agricultura (Compant et al., 2008).

Em humanos, as espécies de *Burkholderia* podem provocar infecções nosocomiais, sendo que pessoas com fibrose cística, uma condição caracterizada por problemas pulmonares crônicos, são especialmente vulneráveis a essas infecções (Eissa, 2024). Isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* são responsáveis por mais de 80% dos casos de infecções bacterianas associadas a fibrose cística no Canadá e em países da Europa (Agodi et al., 2002; Wallner et al., 2019). Em alguns casos, pacientes infectados podem desenvolver a "síndrome de cepacia", caracterizada por insuficiência respiratória progressiva e pneumonia necrotizante, muitas vezes resultando em morte precoce (Jones et al., 2004). Outras espécies também são frequentemente relatadas como causadoras de infecção em humanos, como *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Sfeir, 2018). Na China, em 2024, foi registrado um caso raro de infecção por *B. semiarida* (Kuang et al., 2024), anteriormente identificada apenas como patógeno vegetal dentro do CBC (Velez et al. 2023). O caso envolveu uma paciente imunocompetente, sem doenças primárias associadas, e a infecção persistiu por 3 anos (Kuang et al., 2024).

A dupla natureza de espécies do CBC, agindo tanto como patógeno vegetal quanto como patógeno humano oportunista, ressalta a complexidade desses microrganismos (Eissa, 2024). No entanto, é improvável que isolados de cebola possam infectar humanos e vice-versa, uma vez que a adaptação a novos hospedeiros geralmente resulta na perda de patogenicidade a outros hospedeiros (Ellis; Cooper, 2010).

A detecção e identificação das espécies do CBC envolve uma variedade de técnicas, cada uma com suas próprias vantagens e limitações. Métodos fenotípicos, que avaliam características bioquímicas e fisiológicas como crescimento em meios seletivos e testes de oxidase e catalase, são comuns, mas frequentemente apresentam baixa confiabilidade devido à influência de fatores ambientais e dificuldade em distinguir espécies dentro do CBC. Em contrapartida, métodos moleculares oferecem maior precisão e sensibilidade, empregando técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sequenciamento e hibridização de genes, incluindo 16S rRNA e *recA*. Estes métodos são eficazes para identificar a bactéria até o nível

de espécie e para detectar isolados novos ou raros (Eissa, 2024).

## 5. Técnicas moleculares utilizadas para caracterização de fitobactérias

### 5.1. Sequenciamento da região 16S rRNA

Os marcadores filogenéticos incluem a presença de genes codificadores ou estruturas de proteínas específicas, as combinações desses genes e as suas variantes, sendo o 16S rRNA, um gene de aproximadamente 1500 pares de bases que codifica um RNA catalítico que faz parte da subunidade ribossomal 30S, uma das regiões mais amplamente utilizadas para o reconhecimento de novos táxons de procariotos (Srinivasan et al., 2015). A região 16S rRNA está presente em todas as células procarióticas e tem regiões de sequência conservadas e variáveis, evoluindo em táxons muito diferentes, relevantes para a amplificação universal simultânea e medição de relações filogenéticas próximas e distantes, em muitos casos em nível de espécie, o que garante que esse seja um cronômetro molecular válido para a avaliação do parentesco filogenético dos organismos (Srinivasan et al., 2015).

Com os avanços técnicos e computacionais, a aplicação da análise da sequência do 16S rRNA para a identificação bacteriana foi aprimorada, levando ao aumento da disponibilidade de bancos de dados, o que facilitou a identificação de bactérias. (Gee et al., 2003). Um dos critérios mais amplamente aceitos para a definição de espécies de procariotos com base no sequenciamento da região 16S rRNA é o percentual de identidade da sequência (Stackebrandt; Goebel, 1994). Desta forma, uma similaridade de sequência igual ou menor que 95% entre dois táxons, sugere que eles podem pertencer a gêneros distintos (Tindall et al., 2010). Já para a definição de espécies dentro de um mesmo gênero, uma similaridade acima de 97% pode sugerir que os táxons pertencem a mesma espécie (Stackebrandt; Goebel, 1994).

Com base no sequenciamento da região 16S rRNA, Oliveira et al. (2019) identificaram três grupos principais de bactérias associados à podridão das escamas da cebola na região semiárida do Nordeste brasileiro, pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*. O primeiro grupo, composto por 29 isolados, corresponde ao CBC, sendo o grupo predominante; o segundo grupo inclui 10 isolados da espécie *B. gladioli*, e o terceiro grupo, com seis isolados, corresponde a *P. aeruginosa*. A análise filogenética revelou o agrupamento desses isolados em clados bem definidos com 100% de suporte de probabilidade, confirmando a presença endêmica da podridão das escamas da cebola na região. Apesar do seu uso bem sucedido para a identificação de diversas espécies de fitobactérias, vale destacar que, pelo fato de *B. cepacia* ser formada por espécies estritamente

relacionadas com nível de similaridade nesta região  $\geq 97,5\%$  (Coenye et al., 2001), esta técnica apresenta baixa precisão para a determinação dos relacionamentos genéticos entre os membros do CBC (Vandamme; Dawyndt, 2011). Nestes casos, técnicas complementares como análises de sequências multilocus (Baia et al., 2021) e o sequenciamento de genomas completos (Velez et al., 2023), são mais informativas para a determinação precisa de relacionamentos evolutivos entre as espécies do CBC.

## 5.2. rep-PCR

Dentre os métodos moleculares utilizados para avaliar a diversidade de fitobactérias, tem sido bastante empregada a observação de três famílias de sequências repetitivas, os elementos REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e BOX. Tais observações levaram ao desenvolvimento da rep-PCR, onde primers foram projetados para amplificar o DNA intermediário entre duas sequências repetitivas adjacentes (Trindade; Lima; Ferreira, 2005).

A rep-PCR é uma variação da reação de PCR que ocorre através de elementos ou sequências repetitivas de DNA naturalmente dispersas e presentes em múltiplas cópias em genomas. Permitem a amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, consistindo em sequências situadas entre esses elementos. Vários amplicons (moléculas de DNA amplificadas em outras reações) de tamanhos diferentes podem ser fracionados por eletroforese e permitem o estabelecimento de padrões de impressão digital de DNA específicos para isolados bacterianos individuais. Vários desses elementos repetitivos intercalados são conservados em diversos gêneros de bactérias e, portanto, permitem que conjuntos de primers únicos sejam usados para gerar “fingerprinting” do DNA de muitos microrganismos diferentes (Versalovic et al., 1994).

Os “fingerprinting” gerados refletem a estrutura genética de isolados bacterianos, caracterizando a rep-PCR como uma técnica simples, rápida e reprodutível (Louws et al., 1994). O DNA genômico purificado, extraído de células, pode ser usado diretamente em rep-PCR para gerar perfis genômicos. A detecção e análise de produtos rep-PCR de tamanhos diferentes incluem a inspeção visual de amostras em gel de agarose, métodos de detecção e armazenamento de dados assistidos por computador ou detecção por varredura a laser de produtos de amplificação marcados com fluorocromo (Versalovic et al., 1994).

Por meio da análise de rep-PCR, Baia et al. (2021) distinguiu isolados de *B. cepacia* em 42 grupos distintos ao nível de 80% de similaridade, revelando uma alta variabilidade dentro do CBC. Igualmente, Oliveira et al. (2019) observaram elevada variabilidade dentre os

isolados do CBC, separando 48 isolados em 30 grupos a um nível de 70% de similaridade. De forma semelhante, Seo e Tsuchiya, (2005), visando avaliar a diversidade intraespecífica de *B. cenocepacia*, construíram um dendrograma de 35 isolados da espécie com base nos perfis de rep-PCR. Adicionalmente, estudos com o marcador BOX-PCR são os mais indicados para fins epidemiológicos com isolados de *B. cenocepacia*, caracterizando esse marcador como uma ferramenta eficiente para uma genotipagem inicial (Campana et al., 2005).

### 5.3. Sequenciamento do gene *recA*

O gene codificador de proteínas *recA*, essencial para a recombinação e reparo do DNA, tem sido muito utilizado para identificação de espécies do gênero *Burkholderia*, pois sua sequência de nucleotídeos exibe as mutações existentes entre essas espécies (Cuccui et al., 2007). Dessa forma, o gene é amplamente aplicado sistematicamente bacteriana (Karlin; Weinstock; Brendel, 1995) e demonstra alta eficácia na identificação de espécies do gênero *Burkholderia*, facilitando estudos de diversidade, relações filogenéticas e genótipos destes organismos (Payne et al., 2005). Além disso, análise filogenética da variação da sequência no gene permite a discriminação de espécies do CBC (Mahenthiralingam; Baldwin; Dowson, 2008).

Baia et al., (2021), por meio do sequenciamento do gene *recA*, identificaram quatro clados principais entre 50 isolados do CBC. O Clado I foi composto por 28 isolados representando *B. orbicola*, enquanto o Clado II incluiu 11 isolados representando *B. cenocepacia* da linhagem IIIA. O Clado III foi formado por uma linhagem isolada, não associada a nenhuma espécie conhecida, e o Clado IV incluiu 10 isolados relacionados a uma espécie ainda não identificada de *Burkholderia*. Tais resultados destacam a diversidade filogenética dentro do CBC e o suporte robusto do gene *recA* (Baia et al., 2021).

## 6. Caracterização patológica

Para o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas, é fundamental conhecer o comportamento patológico do patógeno. Desta forma, os componentes epidemiológicos como período de incubação, índice da doença, taxa de progresso e área abaixo da curva de progresso da doença, constituem importantes variáveis para avaliar a intensidade da doença (Campbell; Madden, 1990). Nesse contexto, o período de incubação é o tempo compreendido entre a inoculação do patógeno e o surgimento dos primeiros sintomas (Bergamin-Filho, 1996; Van der Plank, 1963); o índice da doença reflete a severidade da doença; a taxa de progresso da doença revela a velocidade de aumento da severidade da doença no tempo e a área abaixo da curva de progresso da doença constitui a

integração da intensidade da doença entre dois períodos de tempo, utilizada para resumir a curva de progresso da doença (Campbell; Madden, 1990).

Em estudo realizado por Baia et al., (2021) através da caracterização patológica de 84 isolados do CBC, foi possível observar diferenças na severidade das lesões em escamas de cebola, o que permitiu a separação dos isolados em dois grupos estatisticamente distintos de acordo com a agressividade do patógeno, demonstrando variabilidade patogênica (Baia et al., 2021).

## 7. Formação de biofilme

Biofilmes são agregados de microrganismos que formam uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, conhecidas por exopolissacarídeos (EPS), que se formam sobre superfícies bióticas ou abióticas (Flemming et al., 2016). O EPS imobiliza as células bacterianas, mantendo-as unidas, o que permite uma maior interação e comunicação célula-célula (Flemming; Wingender, 2010).

Essas estruturas representam um dos modos de vida mais amplamente distribuídos e bem sucedidos da Terra (Flemming et al., 2016), uma vez que oferecem diversas vantagens aos microrganismos, como maior resistência a estresses ambientais e agentes antimicrobianos, proteção contra predação de protozoários e reações de defesa do hospedeiro, maiores possibilidades de transferência horizontal de genes, além da oportunidade de realizar processos que não seriam possíveis para a célula isolada, como a excreção de metabólitos e exoenzimas (Caraher et al., 2007; Danhorn; Fuqua, 2007).

A formação da matriz é um processo dinâmico e complexo, que envolve a adesão inicial das bactérias à superfície, produção de matriz extracelular e crescimento das células bacterianas (Flemming et al., 2016). Algumas espécies de *Burkholderia*, especialmente as que fazem parte do CBC, são capazes de formar biofilmes *in vitro* e *in vivo*, o que possivelmente desempenha um papel importante na virulência (Savoia; Zucca, 2007).

Em estudo visando caracterizar a capacidade de formação de biofilme em isolados patogênicos de *B. cenocepacia*, *B. orbicola* e *B. gladioli* pv. *alliicola*, Silva et al., (2021) observaram a existência de variação intraespecífica na capacidade de formação de biofilme *in vitro* e uma correlação negativa entre essa estrutura e a motilidade swarming. Foi observado ainda, por meio de microscopia óptica e eletrônica de varredura, a formação de biofilme *in vivo* por isolados dessas espécies em tecidos de cebola (Silva et al., 2021).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) analisar a diversidade de *Burkholderia* spp. causadoras de podridão bacteriana das escamas nas principais regiões

produtoras do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e ii) analisar e caracterizar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* em tecidos de cebola a sua motilidade swarming de isolados fitopatogênicos de *B. sola* e *B. semiarida*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGODI, A.; BARCHITTA, M.; GIANNINÒ, V.; COLLURA, A.; PENSABENE, T.; GARLASCHI, M. L.; PASQUARELLA, C.; LUZZARO, F.; SINATRA, F.; MAHENTHIRALINGAM, E.; STEFANI, S. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: Identification of a cluster of epidemic lineages. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 3, p. 188–195, mar. 2002.

BACHIE, O. G.; SANTIAGO, L. S.; MCGIFFEN, M. E. Physiological responses of onion varieties to varying photoperiod and temperature regimes. **Agriculture 2019, Vol. 9, Page 214**, v. 9, n. 10, p. 214, 1 out. 2019.

BAIA, A. D. B.; SILVA, A. M. F.; RIBEIRO, B. G.; SOUZA, C. C.; SILVA JÚNIOR, W. J.; BALBINO, V. Q.; LEAL, C. M.; DE FARIAS, A. R. G.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Predominance of *Burkholderia cenocepacia* lineages causing onion sour skin in the semi-arid region of north-east Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 3, p. 521–533, 1 abr. 2021.

BERGAMIN-FILHO, A. A. L. **Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico**. São Paulo: Ceres, 1996.

BOEING, G. **Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense**. Santa Catarina: Instituto Cepa, 2002.

BOURNAUD, C.; DE FARIA, S. M.; DOS SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (tribe Mimoseae). **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63478, 15 maio 2013.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, n. 1, 1950.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; SCIACCA, A.; SAVOIA, D.; COLLURA, A.; FISCARELLI, E.; DE INTINIS, G.; BUSETTI, M.; CIPOLLONI, A.; D'APRILE, A.; PROVENZANO, E.; COLLEBRUSCO, I.; FRONTINI, P.; STASSI, G.; TRANCASSINI, M.; TOVAGLIARI, D.; et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: Evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, 2005.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990.

CARAHHER, E.; REYNOLDS, G.; MURPHY, P.; MCCLEAN, S.; CALLAGHAN, M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm *in vitro*. **European Journal of Clinical Microbiology**

**and Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 213–216, 1 mar. 2007.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. **Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex**. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. **Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment**. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008.

CUCCUI, J.; EASTON, A.; CHU, K. K.; BANCROFT, G. J.; OYSTON, P. C. F.; TITBALL, R. W.; WREN, B. W. Development of signature-tagged mutagenesis in *Burkholderia pseudomallei* to identify genes important in survival and pathogenesis. *Infection and immunity*, v. 75, n. 3, p. 1186–1195, mar. 2007.

DANHORN, T.; FUQUA, C. **Biofilm formation by plant-associated bacteria**. *Annual Review of Microbiology*, 2007.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research*, v. 5, 2016.

EISSA, M. Genus *Burkholderia*: A double-edged sword with widespread implications for human health, agriculture, and the environment. *Journal of Biological Research and Reviews*, v. 1, n. 2, p. 79–79, 1 jun. 2024.

ELLIS, C. N.; COOPER, V. S. Experimental Adaptation of *Burkholderia cenocepacia* to Onion Medium Reduces Host Range. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 8, p. 2387, abr. 2010.

EPAGRI. **Sistema de produção para a cebola: Santa Catarina**. Epagri Sistemas de Produção. 4º revisão. Florianópolis: 2013, v. 46, 106 p.

FAO. **Crops and livestock products**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.

FILGUEIRA, F. A. R. Aliáceas: cebola e outros condimentos. Em: FILGUEIRA, F. A. R. (Ed.). **Novo manual de olericultura**. 3º ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. p. 255–278.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. **Biofilms: An emergent form of bacterial life**. *Nature Reviews Microbiology*, 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. **The biofilm matrix**. *Nature Reviews Microbiology*, 2010.

IBGE. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.

JONES, A. M.; DODD, M. E.; GOVAN, J. R. W.; BARCUS, V.; DOHERTY, C. J.; MORRIS, J.; WEBB, A. K. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: Influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*, v. 59, n. 11, 2004.

KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010.

KARLIN, S.; WEINSTOCK, G. M.; BRENDDEL, V. Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6881–6893, 1995.

KHOSA, J. S.; MCCALLUM, J.; DHATT, A. S.; MACKNIGHT, R. C. Enhancing onion breeding using molecular tools. **Plant Breeding**, v. 135, n. 1, p. 9–20, 1 fev. 2016.

KIILL, L. H. P.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J. Botânica. Em: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. (Eds.). **Cultivo da cebola no Nordeste**. Versão eletrônica: Embrapa Semiárido, 2007. p. 9–11.

KUANG, D.; LIU, F.; TIAN, S.; LIU, W.; LI, A.; ZHOU, Y.; HUANG, H.; XIA, Q. *Burkholderia semiarida* as Cause of Recurrent Pulmonary Infection in Immunocompetent Patient, China. **Emerging infectious diseases**, v. 30, n. 6, 1 jun. 2024.

KUNZ, V. L.; SIRTOLI, L. F.; FURLAN, L.; POLETTI, L.; PRIMO, M. A.; RODRIGUES J. D. Produtividade de cebola sob diferentes fontes e modos de aplicação de adubos nitrogenados em cobertura. **Biodiversidade**, v. 8, n. 1, 2009.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, 1994.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, 2008.

MALAVOLTA, V.; BERIAM, L.; ALMEIDA, I.; RODRIGUES, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 9–88, 2008.

MALLOR, C.; CARRAVEDO, M.; ESTOPAÑAN, G.; MALLOR, F. Characterization of genetic resources of onion (*Allium cepa* L.) from the Spanish secondary centre of diversity. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 1, p. 144–155, 2011.

MARCONATTO, L. J.; KOEHLER, H. S.; MARCUZZO, L. L. Incidência de doenças em cebola armazenada na região do alto vale do Itajaí/SC. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 243–245, 1 jul. 2017.

MARCUZZO, L. L.; DUFFECK, M. R.; HAVEROTH, R.; ELI, K.; NUNES, R. C. T.; CARVALHO, J.; OLIVEIRA, R. J. P. DE. Severidade de doenças foliares em mudas de cebola produzidas em túnel baixo. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 4, 2018.

MARQUES, A. S. DOS A. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: Embrapa-CPI/Embrapa Cenargen, 1994.

MARTINA, P.; LEGUIZAMON, M.; PRIETO, C. I.; SOUSA, S. A.; MONTANARO, P.;

DRAGHI, W. O.; STÄMMLER, M.; BETTIOL, M.; DE CARVALHO, C. C. C. R.; PALAU, J.; FIGOLI, C.; ALVAREZ, F.; BENETTI, S.; LEJONA, S.; VESCINA, C.; FERRERAS, J.; LASCH, P.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, A.; et al. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 1, p. 14–20, 1 jan. 2018.

MCDONALD, M. R.; JAIME, M. DE LOS A. J.; HOVIUS, M. H. Y. H. Management of Diseases of Onions and Garlic. Em: NAQVI, S. A. M. H. N. (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**. Dordrecht: Springer, 2004. p. 149–200.

MENEZES JÚNIOR, F. O.; KURTZ, C. Produtividade da cebola fertirrigada sob diferentes doses de nitrogênio e densidades populacionais. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 571–579, 1 out. 2016.

MENEZES-JÚNIOR, F. O. GERVINI.; NETO, J. V. Produção da cebola em função da densidade de plantas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 733–739, 2012.

OLIVEIRA, W. J.; SILVA, W. A.; SILVA, A. M. F.; CANDEIA, J. A.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of onion (*Allium cepa*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 11, 2017.

OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. B.; SILVA, A. M. F.; LIMA, N. B.; LEAL, C. M.; CANDEIA, J. A.; GAMA, M. A. S. Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 6, 2019.

PALLERONI, N. J.; HOLMES, B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 479–481, 1 out. 1981.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 255–258, 2001.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3917–3927, jul. 2005.

PEETERS, C.; ZLOSNIK, J. E. A.; SPILKER, T.; HIRD, T. J.; LIPUMA, J. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 7, p. 483–489, out. 2013.

PEIXOTO, A. R.; GONÇALVES, M. L. A.; GUERRA, M. L.; SÁ, G. P.; BEZERRA, J.; NÓBREGA, T. Bactérias fitopatogênicas emergentes no Brasil. Em: GAMA, M. A. S. et al. (Eds.). **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**. Recife: EDUFERPE, 2016. p. 291–308.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana**. Embrapa Agrobiologia, 2006. 32 p.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; LEITE, D. L. **Melhoramento Genético de Cebola**

**no Brasil: Avanços e Desafios.** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013.

SAVOIA, D.; ZUCCA, M. Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. **Current microbiology**, v. 54, n. 6, p. 440–444, jun. 2007.

SEO, S. T.; TSUCHIYA, K. Genotypic characterization of *Burkholderia cenocepacia* strains by rep-PCR and PCR-RFLP of the *fliC* gene. **FEMS microbiology letters**, v. 245, n. 1, p. 19–24, 1 abr. 2005.

SFEIR, M. M. *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. **The Journal of infection**, v. 77, n. 3, p. 166–170, 1 set. 2018.

SILVA, A. M. F.; BAIA, A. D. B.; VELEZ, L. S.; OLIVEIRA, W. J.; GAMA, M. A. S. Diversidade taxonômica e patológica de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão das escamas da cebola. Em: DALIO, R. J. D. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2018. v. 26p. 81–95.

SILVA, P. H. R.; ASSUNÇÃO, E. F.; VELEZ, L. DA S.; SANTOS, L. N.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Biofilm formation by strains of *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliicola* associated with onion bacterial scale rot. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 4, p. 1665–1675, 1 dez. 2021.

SONAWANE, R. B.; BIRADE, R. M.; PATIL, H. M.; DHEMRE, J. K. Survey, Occurrence of Major Onion Diseases and Management of Twister Disease of Onion (*Allium cepa* L.). **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 12, n. 11, p. 3676–3682, 4 nov. 2022.

SRINIVASAN, R.; KARAOZ, U.; VOLEGOVA, M.; MACKICHAN, J.; KATO-MAEDA, M.; MILLER, S.; NADARAJAN, R.; BRODIE, E. L.; LYNCH, S. V. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117617, 2015.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1 out. 1994.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, 2010.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, 2005.

VAN DER PLANK, J. E. . **Plant diseases : epidemics and control**. Nova York: Academic Press, 1963.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.;

COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, 1997.

VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 2, p. 87–95, abr. 2011.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 102–111, 2009.

VELEZ, L. S.; ABURJAILE, F. F.; FARIAS, A. R. G.; BAIA, A. D. B.; OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. F.; BENKO-ISEPPON, A. M.; AZEVEDO, V.; BRENIG, B.; HAM, J. H.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, 1 maio 2023.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, 1994.

WALLNER, A.; KING, E.; NGONKEU, E. L. M.; MOULIN, L.; BÉNA, G. Genomic analyses of *Burkholderia cenocepacia* reveal multiple species with differential host-Adaptation to plants and humans. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 2019.

WORDELL-FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. Em: WORDELL-FILHO, J. A. et al. (Eds.). **Manejo Fitossanitário na cultura da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 19–162.

WORDELL-FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Bacterioses da cebola: diagnose e recomendações para o controle integrado. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n. 3, p. 45–47, 2007.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; ET AL. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 12, 1992.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y.; KOSAKO, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiology and immunology**, v. 39, n. 11, p. 897–904, 1995.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E. Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. **Review of Plant Pathology**, v. 75, p. 721–763, 1996.

### **CAPÍTULO III**

---

#### **Etiologia da podridão bacteriana das escamas nas principais regiões produtoras de cebola do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil**

# **Etiologia da podridão bacteriana das escamas nas principais regiões produtoras de cebola do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil**

**Fernanda Larisse dos Santos Lima<sup>1</sup>; Keyla Walescka Lopes da Silva<sup>1</sup>; Maria Clara Lopes Leite<sup>1</sup>; Ailton Reis<sup>2</sup>; Renata Sousa Resende<sup>3</sup>; Nadson de Carvalho Pontes<sup>4</sup>; José Belasque Júnior<sup>5</sup>; Adriano Márcio Freire Silva<sup>6</sup>; Elineide Barbosa de Souza<sup>1</sup>; Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, Brasil, CEP 52171-900; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças. C.P. 218, Brasília-DF, Brasil, CEP: 70351-970; <sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri, Rodovia Admar Gonzaga, 1.347, Itacorubi, Caixa Postal 502, Ituporanga - SC, Brasil, CEP: 88034-901; <sup>4</sup>Instituto Federal Goiano, BR-153, Km 633, Zona Rural, Morrinhos - GO, Brasil, CEP: 75650-000; <sup>5</sup>Departamento de Fitopatologia e Nematologia – LFN, Av. Pádua Dias, 11 – Piracicaba – SP, CEP 13418-900; <sup>6</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil, CEP 57072-900.

## **Resumo**

A cultura da cebola (*Allium cepa* L.) pode ser afetada por diversas doenças, dentre as quais se destaca a podridão bacteriana das escamas, causada principalmente por espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de *Burkholderia* spp. causadoras de podridão bacteriana das escamas nas principais regiões produtoras do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Foi realizada uma abordagem polifásica, que incluiu a coleta dos isolados a partir de bulbos de cebola com sintomas típicos da doença nas principais regiões produtoras de cebola do Brasil, genotipagem por meio do marcador BOX-PCR, análise filogenética com base na região 16S rDNA e no gene *recA* e caracterização patológica. A genotipagem por BOX-PCR separou os isolados em 62 haplótipos e 51 grupos distintos. O sequenciamento da região 16S rDNA permitiu a identificação de isolados pertencentes ao CBC, bem como isolados de *B. gladioli*. A análise do gene *recA* dos isolados de CBC revelou 4 clados, identificando 24 isolados de *B. orbicola*, 10 isolados de *B. remitis* e 3 isolados de *B. ambifaria*, além de um isolado que não se relacionou com nenhuma das espécies conhecidas, indicando a possível existência de uma nova espécie. Além disso, a caracterização patológica evidenciou a variabilidade patogênica entre os isolados.

**Palavras-chave:** complexo *Burkholderia cepacia*; *Allium cepa*, rep-PCR; 16S rDNA; *recA*.

## Abstract

The onion crop (*Allium cepa* L.) can be affected by several diseases, among which sour skin, primarily caused by species of the *Burkholderia cepacia* complex (BCC), stands out. The objective of this study was to analyze the diversity of *Burkholderia* spp. causing sour skin in the main onion-producing regions of Southern, Southeastern, and Central-West Brazil. A polyphasic approach was applied, including the collection of isolates from onion bulbs showing typical disease symptoms in the main onion-producing regions of Brazil, genotyping using the BOX-PCR marker, phylogenetic analysis based on the 16S rDNA region and the *recA* gene, and pathological characterization. Genotyping by BOX-PCR separated the isolates into 62 haplotypes and 51 distinct groups. Sequencing of the 16S rDNA region enabled the identification of isolates belonging to the BCC, as well as isolates of *B. gladioli*. Analysis of the *recA* gene from the BCC isolates revealed 4 clades, identifying 24 isolates of *B. orbicola*, 10 isolates of *B. remitis*, and 3 isolates of *B. ambifaria*, in addition to one isolate that did not cluster with any known species, indicating the possible existence of a new species. Furthermore, pathological characterization highlighted the pathogenic variability among the isolates.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex; *Allium cepa*; rep-PCR; 16S rDNA; *recA*.

A cultura da cebola (*Allium cepa* L.) é a mais importante em termos de volume de produção e valor econômico dentro do gênero *Allium* (Kiill; Resende; Souza, 2007) e ocupa o terceiro lugar dentre as hortaliças em importância econômica no Brasil e no mundo (Menezes Júnior; Kurtz, 2016). No ano de 2022, a produção mundial de cebola foi superior a 110 milhões de toneladas (FAO, 2024), ao passo em que, no mesmo ano, o Brasil obteve uma produção de 1.656.076 toneladas (IBGE, 2024), destacando-se como maiores produtores as regiões Sul e Sudeste, seguidas pelo Nordeste e Centro-Oeste (159.177) (IBGE, 2024).

A cultura é suscetível a diversas doenças, entre as quais a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), que se destaca devido ao seu impacto econômico, podendo levar a perdas de até 50% na comercialização dos bulbos (Wordell-Filho; Stadnik, 2007).

A podridão bacteriana das escamas foi inicialmente atribuída a *B. cepacia* (ex. *Pseudomonas cepacia*) (Burkholder 1950). No entanto, desde meados da década de 90, isolados de diferentes espécies estreitamente relacionadas foram classificados equivocadamente como *B. cepacia*, o que levou a divisão desses isolados em cinco

genomovares, os quais foram coletivamente chamados de complexo *B. cepacia* (Coenye et al., 2001). Atualmente, o CBC é composto por 26 espécies, as quais podem ser identificadas de forma acurada por meio de análises moleculares como o sequenciamento do gene *recA* (Baia et al., 2021; Peeters et al., 2013) e análises taxogenômicas (Morales-Ruiz et al., 2022; Vanlaere et al., 2009; Velez et al., 2023). Além disso, as espécies que compõem esse grupo podem ocupar diferentes nichos ecológicos (Parke; Gurian-Sherman, 2001) e causar doenças em humanos (Kuang et al., 2024; Shaikh et al., 2023), animais (Cain et al., 2018) e plantas (Baia et al., 2021; Oliveira et al., 2019; Velez et al., 2023).

Embora a podridão bacteriana das escamas da cebola seja uma doença de ocorrência generalizada (Wordell-Filho; Boff, 2006), poucas pesquisas tem sido realizadas sobre a diversidade das espécies associadas a doença, as quais restringem-se a observação de isolados de *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, and *B. pyrrocinia* em cebolas no Japão (Tsuji; Kadota, 2020), e no Brasil, onde a prevalência de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* tem sido observada nas principais regiões produtoras da região Nordeste do país (Baia et al., 2021; Oliveira et al., 2019). Também nessa região, nos estados de Pernambuco e da Bahia, duas espécies novas, *B. sola* e *B. semiarida*, foram registradas causando podridão bacteriana das escamas (Velez et al., 2023), sugerindo que outras espécies do CBC ainda não identificadas podem estar associadas a doença. Adicionalmente, embora a podridão bacteriana das escamas já tenha sido relatada em diferentes estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil, ainda não se conhece a diversidade de espécies do CBC que estão associadas a doença nessas regiões, pois o agente causal foi sempre assinalado como *B. cepacia* (Malavolta Jr. et al., 2008).

Considerando que o conhecimento da diversidade das espécies associadas às doenças é fundamental para compreender aspectos epidemiológicos e desenvolver estratégias de manejo mais eficazes (Coenye; Vandamme, 2003; Compant et al., 2008), o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de *Burkholderia* spp. associadas a podridão bacteriana das escamas da cebola nas principais regiões produtoras do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Para alcançar esse objetivo, foram realizadas análises patológicas, moleculares (rep-PCR) e filogenéticas (gene *recA*) que permitiram a identificação acurada das espécies associadas a doença.

## Material e métodos

### Isolados bacterianos, condições de cultivo e testes de patogenicidade

Bulbos de cebola apresentando sintomas típicos de podridão de escamas em estágio

intermediário da doença foram coletados nos principais municípios produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, em plantações de cebola e centros de classificação e distribuição. Foram realizadas coletas em Brasília (DF), Cristalina (GO), São Gotardo (MG), São José do Rio Pardo (SP), Monte Alto (SP) e Ituporanga (SC).

Para isolamento dos patógenos, pequenas amostras em áreas de transição entre os sintomas e áreas saudáveis foram retiradas e desinfestadas em toalhas de papel umedecidas com álcool 70% por 30 segundos e posteriormente foram maceradas em água destilada esterilizada (ADE). Em seguida, o macerado foi repicado em placa de Petri contendo meio semisseletivo para *Burkholderia* spp., trypan blue tetracycline (TBT) (20g/L de ágar, 5g/L de dextrose, 1 g/L de L-asparagina, 1 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L de trypan blue, 0,01 g/L de tetraciclina). As placas foram mantidas em estufas do tipo BOD (Biochemistry Oxygen Demand) durante 36 horas a 29°C (±0,5°C).

Todos os isolados de *Burkholderia* spp. foram testados quanto à sua patogenicidade. Para isso, foram utilizados catafilos de cebola, onde uma suspensão bacteriana foi preparada a partir de uma cultura pura dos isolados, com concentração ajustada em fotocolorímetro com absorvância de 570 nm, o que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Para a inoculação, foi realizado um ferimento no catafilo com auxílio de alfinete entomológico e, posteriormente, foram depositados 10 µL da suspensão no centro do ferimento. Catafilos similarmente tratados com ADE foram utilizados como testemunha. A avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação, sendo verificada a presença ou ausência de sintomas da doença. O patógeno foi reisolado de lesões 48 horas após a inoculação, completando assim os postulados de Koch. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os isolados foram posteriormente preservados pelos métodos de preservação em ADE, tampão fosfato, tiras de papel filtro e liofilização, e depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM), do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### **Caracterização patológica**

Os isolados coletados foram inoculados em catafilos de cebola. Foram feitos ferimentos com o auxílio de uma almofada de alfinete entomológico e posteriormente foram depositados 10 µL de suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) sobre os ferimentos. Catafilos tratados de forma semelhante com ADE constituíram o controle negativo. Após as inoculações, os catafilos foram depositados em placas de Petri esterilizadas e mantidos em uma câmara úmida a 30°C, durante 48 horas. Os catáfilos foram avaliados em intervalos de

uma hora para determinação do período de incubação, e às 48 horas, para determinação da severidade, medindo-se as lesões com o auxílio de um paquímetro. Foram realizados dois experimentos, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos aos pressupostos da análise de variância e as médias foram agrupadas por meio do teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ), com auxílio do programa Statistix 9.0.

## **Caracterização molecular**

### **Extração de DNA genômico**

A extração do DNA dos isolados foi realizada conforme o protocolo proposto por Gama e Covello (2016). A quantificação do DNA foi realizada através do Biodrop™ (Cambridge, Reino Unido) e sua integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em TBE 1X. A aliquota foi composta por 5 µL de DNA concentrado, 3 µL de 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences, Ontário, Canadá) e 2 µL de SYBR® Safe (10X) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A eletroforese foi realizada por 1h e 30 min a 80 V. O gel foi fotodocumentado e posteriormente a concentração de DNA foi ajustada para 20 ng/µL, sendo armazenada a -20°C.

### **BOX-PCR**

A genotipagem dos isolados foi realizada por meio de BOX-PCR, conforme descrito por (Louws et al., 1994). As reações foram compostas por 1X PCR Master Mix 2X (0,05 U/µL de Taq DNA-polimerase, tampão de reação, 4 mM de cada dNTP) (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), 2 µM do iniciador e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador TC-9639 (Loccus, Brasil). Reações livres de DNA foram incluídas como controle em todos os experimentos para avaliar a presença de contaminantes. As reações de amplificação foram coradas usando uma mistura contendo 10 µL da reação, 3 µL de 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences, Ontário, Canadá) e 2 µL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 3 horas a 80 V em tampão TBE 1X e posteriormente fotodocumentados.

### **Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA**

A partir da análise de BOX-PCR, 51 isolados foram selecionados para amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA, sendo um isolado de cada grupo de BOX-PCR. Um fragmento de 250 pb foi amplificado utilizando os primers 16S F

(GGCAGCAGTGGGGAATTTTG) e 16S R (TAGCCTGCCAGTCACCAATG) (Oliveira, 2019). As reações foram compostas por 1X de PCR Master Mix 2X, 2 µM de cada primer e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas usando o termociclador TC-9639, nas seguintes condições: desnaturação inicial por 2 min a 95°C, seguindo-se por 30 ciclos de 2 min a 95°C (desnaturação), 30 s a 45°C (anelamento dos primers) e 4 min a 72°C (extensão das novas fitas de DNA). Em seguida, um ciclo de 20 minutos a 72°C foi realizado para a extensão final. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% em uma corrida realizada por 1,0 horas, na tensão de 80 V, em tampão TBE 0,5X, usando o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Os produtos da PCR foram purificados com as enzimas Exonuclease I (Exo I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento do produto da PCR foi realizado utilizando o sequenciador ABI modelo 3700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), por meio do protocolo do fabricante, utilizando-se o kit de reação de sequenciamento BigDye Terminator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### **Análise do gene *recA***

Diante do resultado do sequenciamento da região 16S DNA, todos os isolados que não foram classificados previamente como *B. gladioli* foram selecionados para a análise de sequência do gene *recA*, totalizando 38 isolados. A amplificação de um fragmento de 704 pb dos isolados foi realizada utilizando os primers AGGACGATTCATGGAAGAWAGC e GACGCACYGAYGMRTAGAACTT (Spilker et al., 2009). As reações foram compostas por 1X PCR Master Mix 2X, 2 µM de cada primer e 200 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador TC-9639, nas seguintes condições: 2 min a 95°C, seguindo-se por 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturação), 30 s a 58°C (anelamento dos primers) e 60 s a 72°C (extensão das novas fitas de DNA). Um ciclo de 5 minutos a 72°C foi realizado para a extensão final. Os fragmentos amplificados foram visualizados, purificados e sequenciados conforme já descrito.

### **Análises filogenéticas**

A qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem dos consensos foram avaliadas utilizando o Staden Package (Staden; Beal; Bonfield, 1999). As sequências foram submetidas à análise com o algoritmo Blastn, disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para a determinação das

relações filogenéticas entre os isolados que não fizeram parte do CBC, com base nas sequências do gene 16S rDNA, foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências (MAS) utilizando o ClustalW disponível no MEGA v. 11. A construção das árvores filogenéticas foi realizada pelo método de Neighbor-Joining. Para análise do gene *recA*, o MAS foi realizado utilizando a versão online do MAFFT v.7 (Kato; Rozewicki; Yamada, 2018). As relações evolutivas foram analisadas através de máxima verossimilhança (MV) utilizando o software IQ-TREE (v. 2.3.6) (Trifinopoulos et al., 2016). A árvore de MV foi construída por meio do modelo TPM2 + G4 + I, utilizando o teste de razão de verossimilhança aproximada com interpretação de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT), com 1000 bootstraps (Trifinopoulos et al., 2016). A visualização da árvore foi realizada utilizando o software FigTree v. 1.4.3. (Rambaut, 2016).

## **Resultados**

### **Isolados bacterianos e testes de patogenicidade**

Foram obtidos 103 isolados apresentando colônias típicas do gênero *Burkholderia* em meio TBT: tamanho pequeno a médio, circulares, com bordas lisas e coloração variando entre brancas, azuladas e amareladas (Tabela 1). Destes, 32 isolados foram coletados na região Sul, 47 na região Sudeste e 24 na região Centro-Oeste. Na região Sul, todos os 32 isolados foram provenientes do município de Ituporanga, em Santa Catarina (SC). Na região Sudeste, os isolados foram oriundos dos municípios de Monte Alto (28 isolados) e São José do Rio Pardo (16 isolados), ambos em São Paulo (SP), além de São Gotardo (3 isolados), em Minas Gerais (MG). Na região Centro-Oeste, 20 isolados foram obtidos do município de Cristalina, em Goiás (GO), e 4 de Brasília, no Distrito Federal (DF). (Figura 1). Adicionalmente, todos os isolados foram patogênicos a cebola e induziram os sintomas típicos da podridão bacteriana das escamas, sendo reisolados às 48 horas após as inoculações, completando-se os postulados de Koch.

### **Caracterização patológica**

Com base na severidade da doença, os 103 isolados analisados foram divididos em quatro grupos (a, b, c, d). O grupo a incluiu 10 isolados, apresentando lesões que variaram de 16,52 a 19,78 mm. Já o grupo b foi formado por 11 isolados, com lesões entre 13,45 e 15,73 mm. No grupo c, 51 isolados causaram lesões entre 10,13 e 13,18 mm, enquanto o grupo d reuniu 31 isolados, com lesões variando de 5,5 a 9,56 mm. Em relação ao período de

incubação, os isolados também foram separados em grupos a, b, c e d. O grupo a (13 isolados) levou de 9,4 a 10 horas para apresentar sintomas, o grupo b (17 isolados) entre 8 e 9,2 horas, o grupo c (52 isolados) de 6,6 a 7 horas, e o grupo d (21 isolados) de 5 a 6,4 horas. Não foi observada uma relação direta entre a severidade e o período de incubação, de forma que os isolados com maiores lesões nem sempre foram os que exibiram um período de incubação mais longo ou mais curto.

## **BOX-PCR**

A genotipagem dos 103 isolados listados na Tabela 1 realizada por meio de BOX-PCR gerou 15 bandas reprodutíveis, variando de 400 a 10.000 pb (Figura 2). A análise resultou na formação de 62 haplótipos e 51 grupos distintos ao nível de 70% de similaridade (Figura 3; Tabela 1). Foram formados um grupo com 12 isolados, um grupo com 11 isolados, dois grupos com 5 isolados, um grupo com 4 isolados, três grupos com 3 isolados, 14 grupos com 2 isolados e 29 grupos foram constituídos por apenas um isolado. Não foram observadas relações entre os grupos formados e os locais de coleta.

## **Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA**

A análise da região 16S rDNA utilizando a ferramenta Blastn permitiu a identificação de 13 isolados como *B. gladioli*, com valores de Blast acima de 97,98% em relação a isolados dessa espécie depositados no Genbank, enquanto 38 isolados apresentaram níveis de similaridade acima de 98,05% em relação a diferentes espécies do CBC.

Os 13 isolados identificados como *B. gladioli* foram utilizados para construção de uma árvore filogenética utilizando-se o método Neighbor-Joining, observando-se que todos eles se agrupam com *B. gladioli*, com valores de bootstrap variando de 50 a 92 (Figura 4). Adicionalmente, pelo fato de não pertencerem ao CBC, esses isolados foram excluídos das análises de sequenciamento do gene *recA*.

## **Gene *recA***

Os 38 isolados analisados por meio do gene *recA* (Figura 4) foram divididos em 4 clados distintos. O primeiro clado foi composto por *Burkholderia ambifaria*, incluindo os isolados CCRMBC341, CCRMBC340 e CCRMBC337. O segundo clado agrupou *Burkholderia remitis* e foi formado pelos isolados CCRMBC311, CCRMBC306, CCRMBC308, CCRMBC382, CCRMBC321, CCRMBC353, CCRMBC312, CCRMBC334, CCRMBC307 e CCRMBC325. O terceiro clado foi composto por *Burkholderia orbicola* e

incluiu os isolados CCRMBC377, CCRMBC375, CCRMBC376, CCRMBC366, CCRMBC374, CCRMBC292, CCRMBC370, CCRMBC356, CCRMBC361, CCRMBC359, CCRMBC380, CCRMBC355, CCRMBC343, CCRMBC322, CCRMBC328, CCRMBC320, CCRMBC323, CCRMBC303, CCRMBC357, CCRMBC358, CCRMBC378, CCRMBC379, CCRMBC305 e CCRMBC365. Além disso, o isolado CCRMBC360 foi alocado em um clado isoladamente e não se agrupou com nenhuma espécie descrita.

## Discussão

O presente trabalho caracterizou 103 isolados de *Burkholderia* spp. coletados a partir de bulbos de cebola apresentando sintomas característicos da podridão bacteriana das escamas no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. A distribuição dos isolados em diferentes grupos de agressividade e períodos de incubação evidencia que houve elevada variabilidade patogênica entre os isolados analisados. A variabilidade patogênica de isolados do CBC associados a cebola foi observada anteriormente (Baia et al., 2021).

A genotipagem realizada por meio de BOX-PCR revelou uma alta diversidade genética entre os isolados, o que indica uma grande variabilidade intraespecífica. A presença de vários grupos em uma amostra relativamente pequena aponta para uma elevada taxa de variação genética, o que é comum para *Burkholderia* spp., conhecidas por sua plasticidade genômica (Vandamme et al., 2000). Adicionalmente, estudos com este marcador têm sido realizados com isolados obtidos a partir de ambientes hospitalares (Campana et al., 2005) e de bulbos de cebola (Baia et al., 2021), revelando uma elevada variabilidade genética entre os isolados de *Burkholderia* spp. Assim, pode-se afirmar que a utilização do BOX-PCR é uma técnica eficaz para a detecção de variações genéticas intraespecíficas entre isolados, permitindo uma avaliação da diversidade de populações bacterianas tanto em ambientes clínicos quanto agrícolas.

Não foi observada uma relação entre os grupos patológicos formados aos grupos de BOX-PCR ou as espécies identificadas, o que aponta para uma complexidade maior no comportamento patogênico dessas bactérias. Compreender esta variabilidade é significativa para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença, uma vez que isolados mais agressivos ou com períodos de incubação mais curtos podem exigir diferentes abordagens nas formas de manejo.

Com base no sequenciamento da região 16S rDNA, o presente estudo identificou isolados de espécies do CBC e *B. gladioli* como as principais espécies associadas a podridão bacteriana das escamas no Brasil. A árvore filogenética construída utilizando o método

Neighbor-Joining para os 13 isolados identificados com *B. gladioli*, com base no gene 16S rRNA, apresentou valores de bootstrap com suporte moderado para os agrupamentos, o que demonstra que o gene 16S rDNA foi eficiente para a identificação das principais espécies. Utilizando a mesma técnica, com isolados provenientes da região semiárida do Nordeste brasileiro, Oliveira et al., (2019) identificaram, além de espécies do CBC causando podridão bacteriana de escamas, *B. gladioli* e *P. aeruginosa* causando podridão das escamas da cebola. No entanto, o estudo não foi suficiente para determinar as espécies do CBC, uma vez que as espécies do complexo compartilham similaridade de sequência acima de 97,5%. Embora o 16S rDNA seja um marcador amplamente utilizado para a identificação de bactérias, ele pode apresentar limitações na separação de espécies dentro de grupos filogeneticamente próximos, como o CBC (Coenye et al., 2001). No presente trabalho, não foram encontrados isolados de *Pseudomonas*, possivelmente devido à abordagem de coleta adotada, em diversas regiões geográficas, o que resultou em uma amostra de isolados menor por região. Estudos anteriores, que concentraram a coleta de isolados em uma única região, como o realizado por Oliveira et al. (2019), conseguiram identificar *Pseudomonas*, provavelmente pela maior intensidade de amostragem em um único local, elevando as chances de isolar patógenos menos prevalentes.

A análise filogenética utilizando o gene *recA* destacou a diversidade entre os isolados de *Burkholderia* spp. O gene *recA* tem sido frequentemente utilizado para estudos de diversidade e relações filogenéticas de espécies dentro do gênero *Burkholderia* (Baia et al., 2021; Payne et al., 2005; Velez et al., 2023). No presente estudo, foi possível determinar a classificação de 37 isolados, evidenciando a diversidade dentro do CBC. A identificação dos isolados por meio do gene demonstra uma clara distinção entre as espécies dentro dos clados analisados, o que reflete a robustez dos dados filogenéticos e a confiabilidade do gene *recA* para identificar as espécies do complexo.

Este estudo contribui para a compreensão da diversidade e variabilidade de *Burkholderia* spp. associadas a podridão bacteriana das escamas em cebola no Brasil, fornecendo uma base para futuras pesquisas focadas em estratégias de manejo da doença.

### Referências bibliográficas

- BAIA, A. D. B.; SILVA, A. M. F.; RIBEIRO, B. G.; SOUZA, C. C.; SILVA JÚNIOR, W. J.; BALBINO, V. Q.; LEAL, C. M.; DE FARIAS, A. R. G.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Predominance of *Burkholderia cenocepacia* lineages causing onion sour skin in the semi-arid region of north-east Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 3, p. 521–533, 1 abr. 2021.
- CAIN, C. L.; COLE, S. D.; BRADLEY, C. W.; CANFIELD, M. S.; MAULDIN, E. A. Clinical and histopathological features of *Burkholderia cepacia* complex dermatitis in dogs: a series of four cases. **Veterinary dermatology**, v. 29, n. 5, p. 457-e156, 1 out. 2018.

- CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; SCIACCA, A.; SAVOIA, D.; COLLURA, A.; FISCARELLI, E.; DE INTINIS, G.; BUSETTI, M.; CIPOLLONI, A.; D'APRILE, A.; PROVENZANO, E.; COLLEBRUSCO, I.; FRONTINI, P.; STASSI, G.; TRANCASSINI, M.; TOVAGLIARI, D.; et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: Evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, 2005.
- COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. **Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex**. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. **Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches**. **Environmental Microbiology**, 2003.
- COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. **Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment**. **FEMS Microbiology Reviews**, 2008.
- FAO. **Crops and livestock products**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- GAMA, M. S. A.; COVELLO, V. N. Técnicas moleculares I – Detecção e identificação de 489 bactérias fitopatogênicas. Em: MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. (Eds.). **Manual de prática em fitobacteriologia**. 3. ed. Recife: EDUFPRPE, 2016. p. 183–198.
- IBGE. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, 2018.
- KIILL, L. H. P.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J. Botânica. Em: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. (Eds.). **Cultivo da cebola no Nordeste**. Versão eletrônica: Embrapa Semiárido, 2007. p. 9–11.
- KUANG, D.; LIU, F.; TIAN, S.; LIU, W.; LI, A.; ZHOU, Y.; HUANG, H.; XIA, Q. *Burkholderia semiarida* as Cause of Recurrent Pulmonary Infection in Immunocompetent Patient, China. **Emerging infectious diseases**, v. 30, n. 6, 1 jun. 2024.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, 1994.
- MALAVOLTA, V.; BERIAM, L.; ALMEIDA, I.; RODRIGUES, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 9–88, 2008.
- MENEZES JÚNIOR, F. O.; KURTZ, C. Produtividade da cebola fertirrigada sob diferentes

- doses de nitrogênio e densidades populacionais. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 571–579, 1 out. 2016.
- MORALES-RUIZ, L. M.; RODRÍGUEZ-CISNEROS, M.; KERBER-DÍAZ, J. C.; ROJAS-ROJAS, F. U.; IBARRA, J. A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia orbicola* sp. nov., a novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 3, 2022.
- OLIVEIRA, W. J. **Estrutura populacional e obtenção de primers específicos para a identificação de *Burkholderia cenocepacia***. Tese. Doutorado em Fitopatologia—Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.
- OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. B.; SILVA, A. M. F.; LIMA, N. B.; LEAL, C. M.; CANDEIA, J. A.; GAMA, M. A. S. Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 6, 2019.
- PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 255–258, 2001.
- PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3917–3927, jul. 2005.
- PEETERS, C.; ZLOSNIK, J. E. A.; SPILKER, T.; HIRD, T. J.; LIPUMA, J. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 7, p. 483–489, out. 2013.
- RAMBAUT, A. **FigTree v1.4.3**. Disponível em: <<https://github.com/rambaut/figtree/releases>>. Acesso em: 31 ago. 2024.
- SHAIKH, M.; SHAIKH, H.; KHAN, F.; DEVI, D.; MEMON, K.; ZAMEER, S.; AAMIR, K.; RAMZAN, A.; SHEIKH, M. *Burkholderia Cepacia*, an Emerging Nosocomial Pathogen in Neonates. **Pakistan Journal of Medical & Health Sciences**, v. 17, n. 06, p. 410–410, 20 dez. 2023.
- SPILKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; DOWSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607, ago. 2009.
- STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998 BT - Bioinformatics Methods and Protocols. Em: **Bioinformatics Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 132.
- TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016.
- TSUJI, M.; KADOTA, I. Identification and phylogenetic analysis of *Burkholderia cepacia*

complex bacteria isolated from rot of onion bulbs in Tohoku region of Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 86, n. 5, p. 376–386, 1 set. 2020.

VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; DE VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D. P. Identification and Population Structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1042, 2000.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 102–111, 2009.

VELEZ, L. S.; ABURJAILE, F. F.; FARIAS, A. R. G.; BAIA, A. D. B.; OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. F.; BENKO-ISEPPON, A. M.; AZEVEDO, V.; BRENIG, B.; HAM, J. H.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, 1 maio 2023.

WALLNER, A.; KING, E.; NGONKEU, E. L. M.; MOULIN, L.; BÉNA, G. Genomic analyses of *Burkholderia cenocepacia* reveal multiple species with differential host-Adaptation to plants and humans. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 2019.

WORDELL-FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. Em: WORDELL-FILHO, J. A. et al. (Eds.). **Manejo Fitossanitário na cultura da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 19–162.

WORDELL-FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Bacterioses da cebola: diagnose e recomendações para o controle integrado. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n. 3, p. 45–47, 2007.

Tabela 1: Perfil genômico e patogênico dos isolados associados a podridão bacteriana das escamas no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil

| ISOLADO <sup>1</sup> | LOCAL DE COLETA | SEVERIDADE <sup>2</sup> | P.I. <sup>3</sup>   | GRUPO BOX-PCR |
|----------------------|-----------------|-------------------------|---------------------|---------------|
| CCRMBC275            | Cristalina - GO | 11,39 c <sup>4</sup>    | 6,20 d <sup>4</sup> | 51            |
| CCRMBC276            | Cristalina - GO | 8,76 d                  | 5,80 d              | 32            |
| CCRMBC277            | Cristalina - GO | 13,75 b                 | 5,80 d              | 32            |
| CCRMBC278            | Cristalina - GO | 7,23 d                  | 6,40 d              | 50            |
| CCRMBC279            | Cristalina - GO | 9,42 d                  | 6,00 d              | 49            |
| CCRMBC280            | Cristalina - GO | 15,23 b                 | 6,80 c              | 45            |
| CCRMBC281            | Cristalina - GO | 11,80 c                 | 6,00 d              | 32            |
| CCRMBC282            | Cristalina - GO | 5,50 d                  | 5,00 d              | 51            |
| CCRMBC283            | Cristalina - GO | 10,75 c                 | 6,20 d              | 32            |

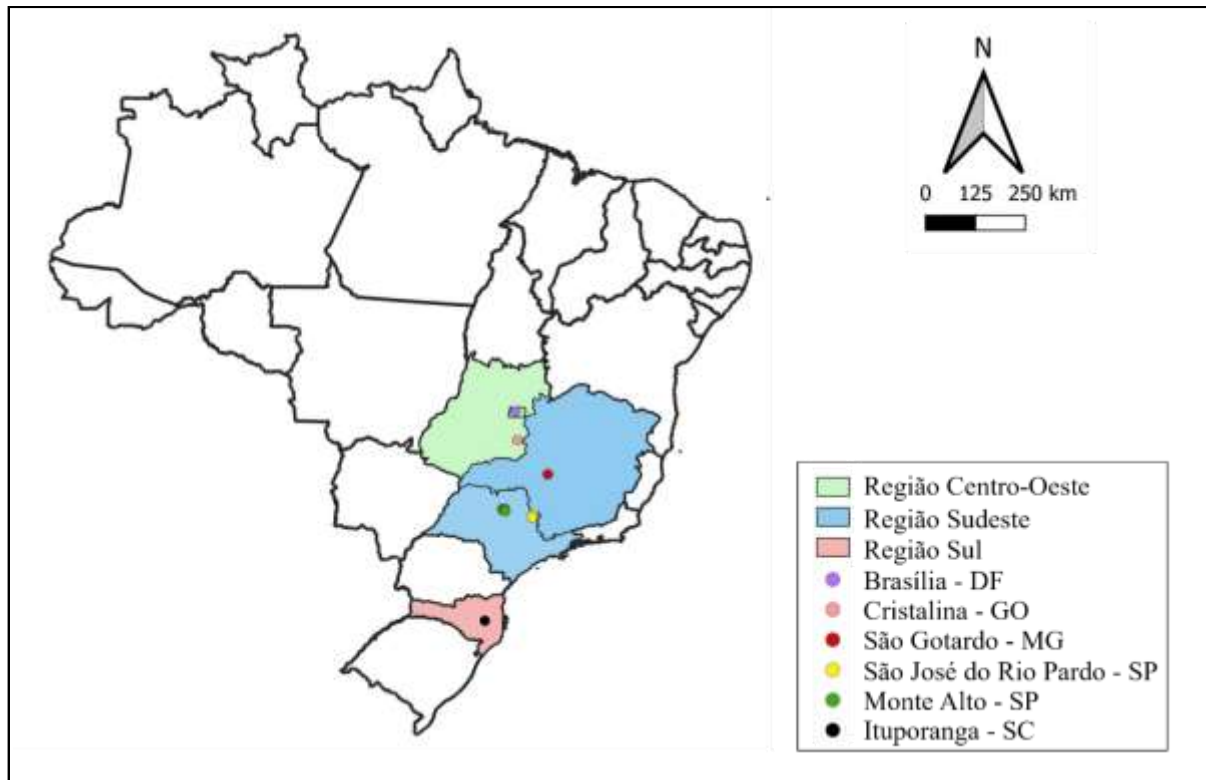
|           |                  |         |         |    |
|-----------|------------------|---------|---------|----|
| CCRMBC284 | Cristalina - GO  | 10,61 c | 8,60 b  | 44 |
| CCRMBC285 | Cristalina - GO  | 10,15 c | 7,80 c  | 32 |
| CCRMBC286 | Cristalina - GO  | 12,20 c | 5,00 d  | 46 |
| CCRMBC287 | Cristalina - GO  | 11,50 c | 5,60 d  | 32 |
| CCRMBC288 | Cristalina - GO  | 11,40 c | 5,20 d  | 32 |
| CCRMBC289 | Cristalina - GO  | 10,50 c | 5,00 d  | 32 |
| CCRMBC290 | Cristalina - GO  | 11,30 c | 5,40 d  | 46 |
| CCRMBC291 | Cristalina - GO  | 10,20 c | 5,20 d  | 46 |
| CCRMBC292 | Cristalina - GO  | 8,38 d  | 8,60 b  | 37 |
| CCRMBC293 | Cristalina - GO  | 12,43 c | 7,80 c  | 36 |
| CCRMBC294 | Brasília - DF    | 10,93 c | 6,40 d  | 32 |
| CCRMBC295 | Brasília - DF    | 13,18 c | 11,40 a | 46 |
| CCRMBC296 | Brasília - DF    | 10,40 c | 5,60 d  | 46 |
| CCRMBC297 | Brasília - DF    | 9,80 d  | 6,20 d  | 32 |
| CCRMBC298 | São Gotardo - MG | 7,69 d  | 10,60 a | 6  |
| CCRMBC299 | São Gotardo - MG | 9,19 d  | 9,80 a  | 6  |
| CCRMBC300 | São Gotardo - MG | 7,53 d  | 9,40 a  | 6  |
| CCRMBC301 | Ituporanga - SC  | 11,27 c | 10,00 a | 41 |
| CCRMBC302 | Ituporanga - SC  | 13,83 b | 7,60 c  | 21 |
| CCRMBC303 | Ituporanga - SC  | 19,33 a | 7,20 c  | 34 |
| CCRMBC304 | Ituporanga - SC  | 13,83 b | 6,60 c  | 26 |
| CCRMBC305 | Ituporanga - SC  | 11,56 c | 7,50 c  | 48 |
| CCRMBC306 | Ituporanga - SC  | 15,73 b | 9,80 a  | 20 |
| CCRMBC307 | Ituporanga - SC  | 13,63 b | 9,40 a  | 36 |
| CCRMBC308 | Ituporanga - SC  | 15,35 b | 7,20 c  | 4  |
| CCRMBC309 | Ituporanga - SC  | 12,38 c | 7,60 c  | 26 |
| CCRMBC310 | Ituporanga - SC  | 10,19 c | 8,30 b  | 11 |
| CCRMBC311 | Ituporanga - SC  | 9,12 d  | 8,00 b  | 13 |
| CCRMBC312 | Ituporanga - SC  | 10,39 c | 6,60 c  | 9  |
| CCRMBC313 | Ituporanga - SC  | 7,53 d  | 9,60 a  | 25 |
| CCRMBC314 | Ituporanga - SC  | 15,27 b | 7,00 c  | 28 |
| CCRMBC315 | Ituporanga - SC  | 11,93 c | 8,60 b  | 28 |
| CCRMBC316 | Ituporanga - SC  | 9,74 d  | 6,00 d  | 15 |
| CCRMBC317 | Ituporanga - SC  | 11,73 c | 7,80 c  | 28 |

|           |                            |         |         |    |
|-----------|----------------------------|---------|---------|----|
| CCRMBC318 | Ituporanga - SC            | 11,65 c | 7,60 c  | 27 |
| CCRMBC319 | Ituporanga - SC            | 16,52 a | 7,20 c  | 21 |
| CCRMBC320 | Ituporanga - SC            | 11,62 c | 6,60 c  | 29 |
| CCRMBC321 | Ituporanga - SC            | 9,62 d  | 7,00 c  | 23 |
| CCRMBC322 | Ituporanga - SC            | 12,17 c | 7,40 c  | 17 |
| CCRMBC323 | Ituporanga - SC            | 12,17 c | 7,40 c  | 43 |
| CCRMBC324 | Ituporanga - SC            | 12,14 c | 7,00 c  | 6  |
| CCRMBC325 | Ituporanga - SC            | 10,62 c | 5,80 d  | 22 |
| CCRMBC326 | Ituporanga - SC            | 17,08 a | 8,20 b  | 6  |
| CCRMBC327 | Ituporanga - SC            | 9,63 d  | 7,20 c  | 41 |
| CCRMBC328 | Ituporanga - SC            | 8,35 d  | 6,80 c  | 16 |
| CCRMBC329 | Ituporanga - SC            | 10,74 c | 7,40 c  | 40 |
| CCRMBC330 | Ituporanga - SC            | 12,82 c | 7,00 c  | 35 |
| CCRMBC331 | Monte Alto - SP            | 8,81 d  | 7,20 c  | 32 |
| CCRMBC332 | Monte Alto - SP            | 19,78 a | 7,00 c  | 32 |
| CCRMBC333 | São José do Rio Pardo - SP | 9,22 d  | 9,80 a  | 29 |
| CCRMBC334 | São José do Rio Pardo - SP | 12,34 c | 9,50 a  | 26 |
| CCRMBC335 | Monte Alto - SP            | 14,06 b | 6,40 d  | 30 |
| CCRMBC336 | Monte Alto - SP            | 10,13 c | 6,20 d  | 30 |
| CCRMBC337 | Monte Alto - SP            | 11,15 c | 8,20 b  | 25 |
| CCRMBC338 | Monte Alto - SP            | 10,93 c | 7,80 c  | 6  |
| CCRMBC340 | Monte Alto - SP            | 11,37 c | 10,40 a | 1  |
| CCRMBC341 | Monte Alto - SP            | 9,70 d  | 8,80 b  | 2  |
| CCRMBC343 | Monte Alto - SP            | 9,74 d  | 8,40 b  | 5  |
| CCRMBC344 | Monte Alto - SP            | 11,36 c | 7,00 c  | 6  |
| CCRMBC346 | Monte Alto - SP            | 8,15 d  | 6,90 c  | 6  |
| CCRMBC348 | Monte Alto - SP            | 16,78 a | 7,40 c  | 6  |
| CCRMBC349 | Monte Alto - SP            | 8,01 d  | 6,60 c  | 6  |
| CCRMBC350 | Monte Alto - SP            | 12,4 c  | 6,60 c  | 30 |
| CCRMBC351 | Monte Alto - SP            | 7,95 d  | 8,50 b  | 8  |
| CCRMBC353 | Monte Alto - SP            | 8,89 d  | 7,40 c  | 3  |
| CCRMBC355 | Monte Alto - SP            | 11,53 c | 7,00 c  | 24 |
| CCRMBC356 | Monte Alto - SP            | 17,64 a | 7,40 c  | 39 |
| CCRMBC357 | Monte Alto - SP            | 7,78 d  | 7,00 c  | 47 |

|           |                            |         |         |    |
|-----------|----------------------------|---------|---------|----|
| CCRMBC358 | Monte Alto - SP            | 19,40 a | 7,60 c  | 8  |
| CCRMBC359 | Monte Alto - SP            | 13,07 c | 8,20 b  | 7  |
| CCRMBC360 | Monte Alto - SP            | 17,56 a | 7,40 c  | 10 |
| CCRMBC361 | Monte Alto - SP            | 13,04 c | 8,20 b  | 33 |
| CCRMBC362 | São José do Rio Pardo - SP | 12,70 c | 7,80 c  | 51 |
| CCRMBC364 | São José do Rio Pardo - SP | 12,51 c | 7,80 c  | 38 |
| CCRMBC365 | São José do Rio Pardo - SP | 13,45 b | 7,00 c  | 35 |
| CCRMBC366 | São José do Rio Pardo - SP | 14,76 b | 8,80 b  | 40 |
| CCRMBC367 | São José do Rio Pardo - SP | 11,78 c | 10,20 a | 19 |
| CCRMBC368 | São José do Rio Pardo - SP | 6,48 d  | 7,00 c  | 51 |
| CCRMBC369 | São José do Rio Pardo - SP | 5,74 d  | 8,20 b  | 6  |
| CCRMBC370 | São José do Rio Pardo - SP | 11,52 c | 7,60 c  | 51 |
| CCRMBC371 | São José do Rio Pardo - SP | 8,15 d  | 6,80 c  | 19 |
| CCRMBC372 | São José do Rio Pardo - SP | 18,68 a | 8,40 b  | 18 |
| CCRMBC373 | São José do Rio Pardo - SP | 10,66 c | 7,60 c  | 19 |
| CCRMBC374 | São José do Rio Pardo - SP | 17,32 a | 7,00 c  | 19 |
| CCRMBC375 | São José do Rio Pardo - SP | 9,56 d  | 7,00 c  | 14 |
| CCRMBC376 | Monte Alto - SP            | 12,05 c | 9,20 b  | 15 |
| CCRMBC377 | Monte Alto - SP            | 8,79 d  | 7,00 c  | 11 |
| CCRMBC378 | Monte Alto - SP            | 10,94 c | 7,40 c  | 18 |
| CCRMBC379 | Monte Alto - SP            | 8,47 d  | 7,60 c  | 12 |
| CCRMBC380 | São José do Rio Pardo - SP | 11,99 c | 10,60 a | 42 |
| CCRMBC381 | Ituporanga - SC            | 10,73 c | 7,20 c  | 31 |
| CCRMBC382 | Ituporanga - SC            | 9,65 d  | 7,60 c  | 31 |
| CCRMBC383 | Ituporanga - SP            | 11,29 c | 7,60 c  | 48 |
| CCRMBC384 | Cristalina - GO            | 11,43 c | 8,40 b  | 10 |

<sup>1</sup>CCRMBC: Coleção de Culturas Rosa Mariano do complexo *Burkholderia cenocepacia*.

<sup>2</sup>Severidade: médias obtidas com base no desenvolvimento da lesão em milímetros, medido horizontalmente e verticalmente. <sup>3</sup>Período de incubação da doença em horas. <sup>4</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).



485

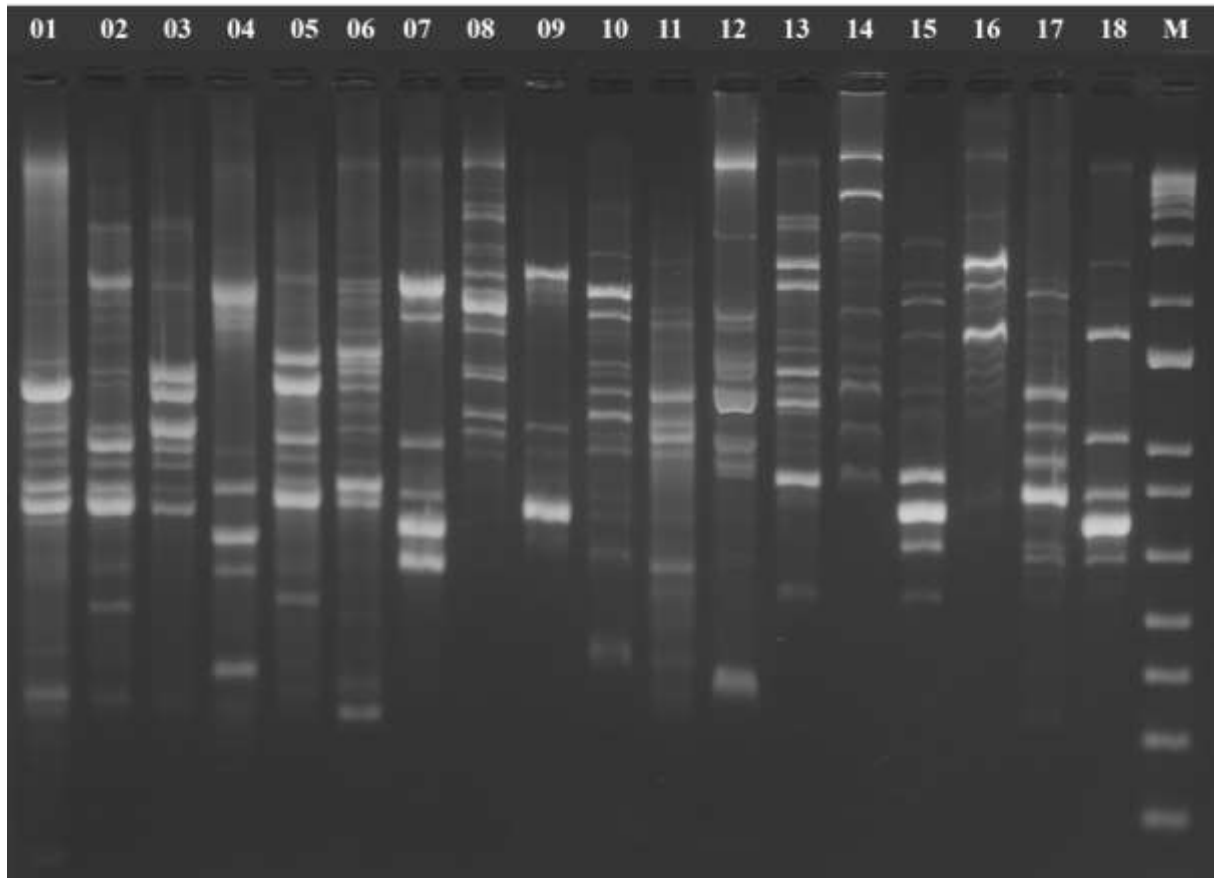
486

487

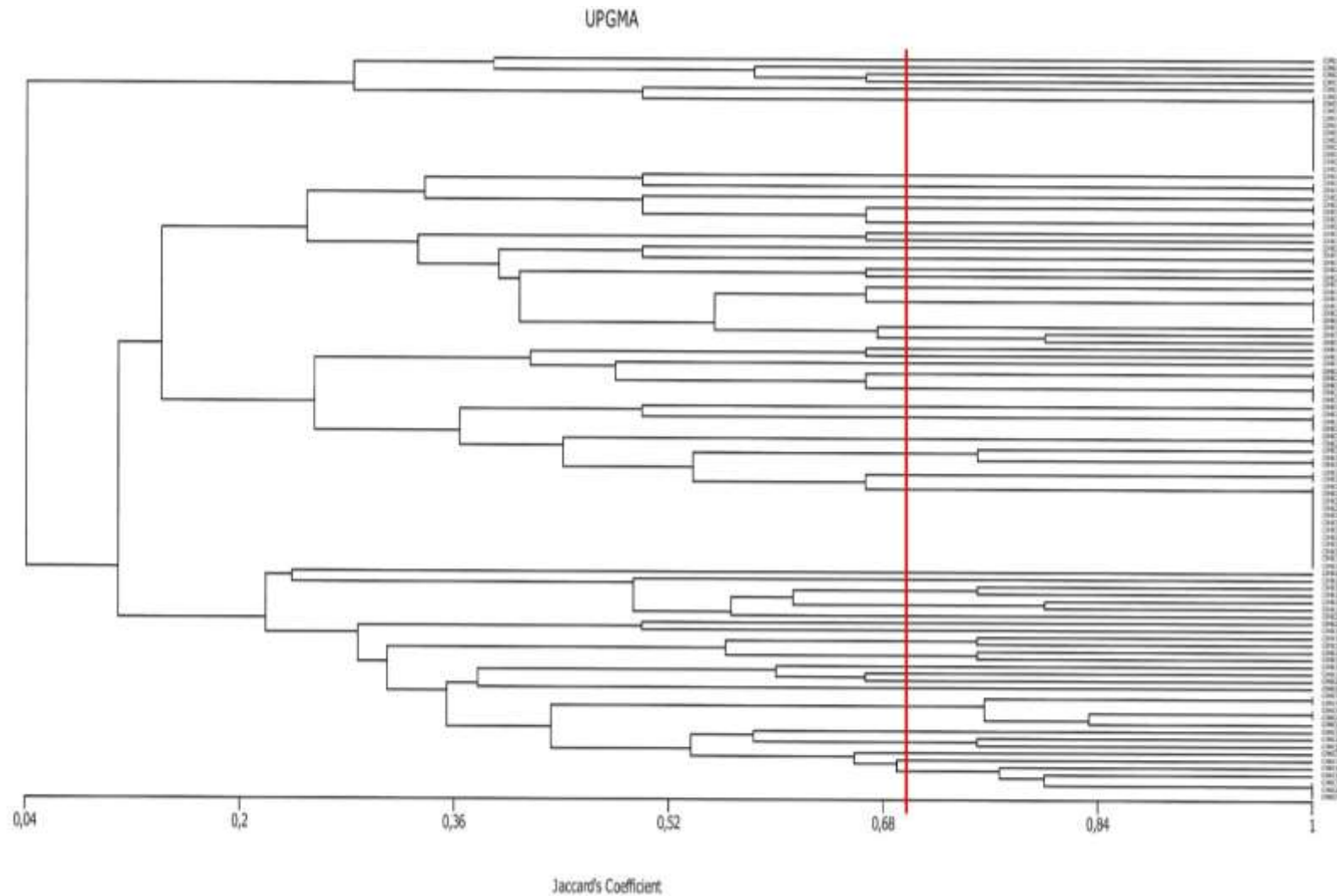
488

489

**Figura 1:** Municípios produtores de cebola localizados nas regiões Centro-Oeste (Brasília – DF; Cristalina - GO), Sudeste (São Gotardo - MG; São José do Rio Pardo – SP; Monte Alto - SP) e Sul (Ituporanga - SC), onde foram coletados os isolados de *Burkholderia* spp. associados à podridão bacteriana das escamas utilizados neste estudo.



**Figura 2:** Perfil genômico de isolados de *Burkholderia* spp. associados a podridão bacteriana das escamas em cebola utilizando a técnica de BOX-PCR. As amostras nos poços estão designadas da seguinte forma: (01) CCRMBC278; (02) CCRMBC280; (03) CCRMBC284; (04) CCRMBC293; (05) CCRMBC296; (06) CCRMBC301; (07) CCRMBC309; (08) CCRMBC312; (09) CCRMBC322; (10) CCRMBC325; (11) CCRMBC334; (12) CCRMBC343; (13) CCRMBC350; (14) CCRMBC353; (15) CCRMBC357; (16) CCRMBC360; (17) CCRMBC370; (18) CCRMBC372. M = Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder.



508

509

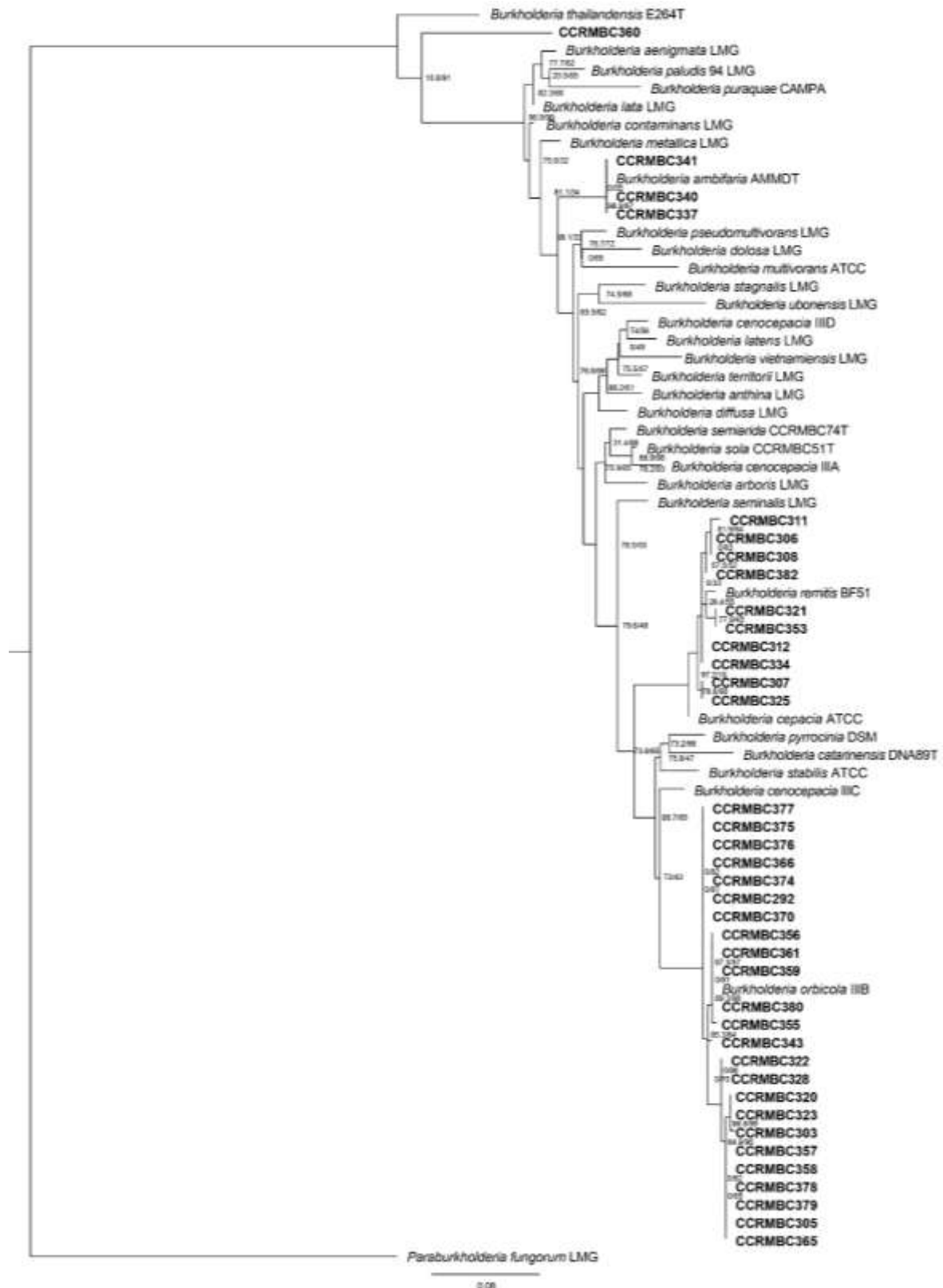
510

511

**Figura 3:** Dendrograma baseado no método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) de acordo com os perfis gerados por BOX-PCR, mostrando as relações entre os isolados de *Burkholderia* spp. causadores da podridão bacteriana das escamas em cebola. A linha vermelha representa um coeficiente de similaridade de 70%, indicando os agrupamentos genéticos a este nível.



**Figura 4:** Árvore filogenética baseada na região 16S rDNA de 13 isolados de *Burkholderia* spp. utilizadas neste estudo e que não fazem parte do CBC. A árvore foi construída utilizando o método de Neighbor Joining. Os valores bootstrap (1000 réplicas) com valores iguais ou superiores a 50 estão indicados em cada nó.



**Figura 5:** Árvore filogenética baseada no gene *recA* de 38 isolados fitopatogênicos de *Burkholderia* spp. obtidos neste estudo. O método de máxima verossimilhança foi utilizado para a construção da árvore. Os valores de SH-aLRT e bootstrap (1000 réplicas) estão indicados em cada nó.

### CAPÍTULO III

---

**Formação de biofilme por *Burkholderia sola* e *B. semiarida*, duas espécies recém descritas causando podridão bacteriana das escamas da cebola**

**Formação de biofilme por *Burkholderia sola* e *B. semiarida*, duas espécies recém descritas causando podridão bacteriana das escamas da cebola**

**Fernanda Larisse dos Santos Lima<sup>1</sup>; Keyla Walescka Lopes da Silva<sup>1</sup>; Maria Clara Lopes Leite<sup>1</sup>; Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque<sup>2</sup>; Bianca Galúcio Pereira Araújo<sup>2</sup>; Glaucilane dos Santos Cruz<sup>3</sup>; Valéria Wanderley Teixeira<sup>3</sup>; Elineide Barbosa de Souza<sup>1</sup>; Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil; <sup>2</sup>Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, 50740-545, Recife, PE, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

**Resumo**

A cebola é uma das culturas agrícolas mais importantes em várias regiões do mundo, porém o seu cultivo pode ser limitado por diversas doenças. Entre essas doenças, se destaca a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). Recentemente, *B. sola* e *B. semiarida* foram identificadas causando a doença, mas seus mecanismos de patogenicidade, especialmente em relação à formação de biofilmes, ainda são pouco compreendidos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* e *in vivo* de isolados fitopatogênicos de *B. sola* e *B. semiarida* obtidos de cebolas com sintomas de podridão bacteriana das escamas, além de avaliar a motilidade *swarming* desses isolados. Para tal, foram realizados testes *in vitro* utilizando diferentes meios de cultura, estudos *in vivo* em catafilos de cebola por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, além da análise da motilidade *swarming*. Os resultados revelaram que os isolados de ambas as espécies formaram biofilmes em diferentes níveis, sendo o meio NYD o mais eficaz para a formação *in vitro*. Através da microscopia óptica, a formação de biofilme foi observada principalmente no parênquima e paredes celulares de catafilos de cebola, que foram degradadas pela ação do patógeno. As análises por microscopia eletrônica destacaram diferenças morfológicas nos biofilmes entre os isolados. Além disso, foi observada uma relação inversa entre a formação de biofilme e a motilidade *swarming*, sugerindo que essas características desempenham papéis complementares na colonização e patogenicidade de *B. sola* e *B. semiarida* em cebola. Em conjunto, esses resultados fornecem insights importantes sobre o comportamento patológico do patógeno.

**Palavras-chave:** complexo *Burkholderia cepacia*; exopolissacarídeos, motilidade swarming.

## **Abstract**

Onion is one of the most important agricultural crops in various regions around the world, but its cultivation can be limited by several diseases. Among these diseases, sour skin, caused by species of the *Burkholderia cepacia* complex (BCC), stands out. Recently, *B. sola* and *B. semiarida* have been identified as causing the disease, but their pathogenicity mechanisms, especially regarding biofilm formation, are still poorly understood. Thus, the present study aimed to analyze the in vitro and in vivo biofilm formation capacity of phytopathogenic isolates of *B. sola* and *B. semiarida* obtained from onions with symptoms of sour skin and to evaluating the swarming motility of these isolates. For this, in vitro tests were carried out using different culture media; in vivo studies were carried out on onion scales using optical microscopy and scanning electron microscopy, and swarming motility analysis was performed. The results revealed that the isolates of both species formed biofilms at different levels, with NYD medium being the most effective for in vitro formation. Through optical microscopy, biofilm formation was mainly observed in the parenchyma and cell walls, which were degraded by the pathogen's action. The electron microscopy analyses highlighted morphological differences in the biofilms between the isolates. Furthermore, an inverse relationship was observed between biofilm formation and swarming motility, suggesting that these characteristics play complementary roles in the colonization and pathogenicity of *B. sola* and *B. semiarida* in onions. These results provide important insights into the pathological behavior of the pathogen.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex; exopolysaccharides, swarming motility.

A cebola (*Allium cepa* L.) é a espécie mais cultivada no gênero *Allium* e uma das mais importantes no setor agrícola, sendo amplamente cultivada em diversas regiões do mundo devido à sua relevância econômica e ao seu papel essencial na alimentação humana (Dimayacyac; Balendres, 2023). No Brasil, a cebola representa uma significativa fonte de renda para pequenos e grandes produtores (Resende; Costa, 2007). Nesse sentido, no ano de 2022, a produção mundial de cebola foi superior a 110 milhões de toneladas (FAO, 2024), ao passo em que, no mesmo ano, o Brasil obteve uma produção de 1.656.076 toneladas (IBGE, 2024), o que demonstra a relevância dessa cultura.

A cebolicultura enfrenta desafios fitossanitários consideráveis, uma vez que é

suscetível e predisponível a diversas doenças (Dimayacyac; Balendres, 2023). Nesse contexto, a podridão bacteriana das escamas se destaca como um dos principais problemas para a cultura, pois é responsável por perdas de até 50% na comercialização dos bulbos (Wordell-Filho; Boff, 2006). As principais espécies associadas à podridão bacteriana das escamas pertencem ao complexo *B. cepacia* (CBC) (Silva et al., 2018), que é composto atualmente por um grupo versátil de 26 espécies intimamente relacionadas (Eberl; Vandamme, 2016; Morales-Ruíz et al., 2022; Velez et al., 2023), as quais podem ser encontradas em variados ambientes ao redor do mundo, como água de rios, solo, plantas, ambientes hospitalares e humanos (Martina et al., 2018). Dentre as espécies do CBC, *B. cenocepacia* Vandamme et al. (Oliveira et al., 2017), *B. orbicola* (Morales-Ruíz, et al., 2022), *B. cepacia* (Palleroni e Holmes, 1981) Yabuuchi et al. (1992), *B. semiarida* Velez et al. e *B. sola* Velez et al. (Velez et al., 2023) têm sido observadas causando podridão bacteriana das escamas. A doença caracteriza-se pelo seu típico odor avinagrado e afeta principalmente as escamas externas dos bulbos de cebola, conferindo-lhes uma aparência úmida e coloração amarelada (Wordell-Filho; Stadnik, 2007).

Além de causarem podridão bacteriana das escamas da cebola, isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* se comportam como patógenos oportunistas e causam infecção em humanos imunocomprometidos e estão associados a casos de fibrose cística (Agodi et al., 2002; Wallner et al., 2019). Em alguns casos, pacientes infectados podem desenvolver a "síndrome de cepacia", caracterizada por insuficiência respiratória progressiva e pneumonia necrotizante, muitas vezes resultando em morte precoce (Jones et al., 2004). Outras espécies também têm sido frequentemente relatadas como causadoras de infecção em humanos, como *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Sfeir, 2018). Além dessas espécies, em 2024, foi registrado um caso raro de infecção por *B. semiarida* (Kuang et al., 2024), anteriormente identificada apenas como um fitopatógeno dentro do CBC, isolado CCRMBC51 (Velez et al., 2023). O caso envolveu uma paciente imunocompetente, sem doenças primárias associadas, e a infecção persistiu por 3 anos (Kuang et al., 2024). Assim, considerando que a formação de biofilme é comumente observada em isolados do CBC associados a infecções em humanos (Coenye, 2010; Fazli et al., 2014; Sousa et al., 2017) e a podridão bacteriana das escamas (Silva et al., 2021), o entendimento da dinâmica da formação dessa estrutura pode auxiliar a criação e avaliação de estratégias para redução do inóculo em ambientes hospitalares e agrícolas.

O biofilme oferece diversas vantagens às bactérias, como proteção contra ameaças externas, armazenamento de nutrientes e uma forma eficaz de comunicação através do sistema de *quorum sensing*, devido à proximidade celular (Cacioppo et al., 2023). Essas

propriedades tornam as células bacterianas menos suscetíveis a agentes antibacterianos, uma vez que uma matriz polissacarídica confere proteção a fatores bióticos e abióticos (Caraher et al., 2007).

Recentemente, foi realizado estudo sobre a formação de biofilme por isolados de *B. cenocepacia*, *B. orbicola* e *B. gladioli* pv. *alliicola* associadas à podridão de escamas da cebola provenientes da região semiárida do Nordeste brasileiro (Silva et al., 2021). O estudo revelou que isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* são fortes formadores de biofilme, ao passo em que isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* apresentaram uma menor capacidade de formação de biofilme. Foi demonstrado que isolados mais agressivos, como os de *B. cenocepacia*, produzem biofilmes robustos e com grandes comunidades bacterianas organizadas em agregados densos, ao passo em que isolados menos agressivos, como os de *B. gladioli*, formaram agregados menos densos. Foi analisada ainda a capacidade de motilidade *swarming* dos isolados, demonstrando que isolados de *B. cenocepacia* apresenta motilidade superior a de *B. orbicola*, que, por sua vez, é superior a *B. gladioli* pv. *alliicola* (Silva et al., 2021).

Visto que a capacidade de *B. sola* e *B. semiarida* de formar biofilmes pode ser um fator importante para sua virulência e persistência no ambiente, a compreensão dessa dinâmica é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo que contribuam para redução do inóculo e das perdas provocadas na cebolicultura. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar e caracterizar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* em tecidos de cebola a sua motilidade *swarming* de isolados fitopatogênicos de *B. sola* e *B. semiarida*.

## **Material e métodos**

### **Isolados bacterianos, condições de crescimento e preparação do inóculo**

Foi utilizado um isolado de *B. sola* (CCRMBC51) e seis isolados de *B. semiarida* (CCRMBC16, CCRMBC17, CCRMBC33, CCRMBC74, CCRMBC131, CCRMBC171), provenientes da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM), do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1). Os isolados foram obtidos de cebolas apresentando sintomas de podridão bacteriana das escamas, coletadas na região do Vale do São Francisco, Brasil (Oliveira et al., 2019). Os isolados de *B. semiarida* foram selecionados de acordo com diferentes níveis de agressividade, conforme previamente descrito (Baia et al., 2021), ao passo em que apenas um isolado de *B. sola* foi

utilizado devido a existência apenas deste isolado até o momento (Velez et al., 2023).

Os isolados foram reativados em placas de Petri contendo meio azul de tripano acrescido de tetraciclina (TBT) (20g/L de ágar, 5g/L de dextrose, 1 g/L de L-asparagina, 1 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L de trypan blue, 0,01 g/L de tetraciclina). As placas foram mantidas em estufas do tipo BOD (Biochemistry Oxygen Demand) durante 36 horas à 29°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio NYDA (20g/L de ágar, 10 g/L de dextrose, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de peptona) e as placas mantidas em estufas do tipo BOD (Biochemistry Oxygen Demand) durante 36 horas à 29°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

### **Formação de biofilme *in vitro***

Os experimentos foram conduzidos em microplacas de poliestireno de 96 poços, com fundo chato transparente (Costar® 3599; Corning Inc., USA), utilizando cinco diferentes meios de cultura líquidos: KADO (10 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 8 g L<sup>-1</sup> de ácido-caseína hidrolisada, 4 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2 g L<sup>-1</sup> de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,3 g L<sup>-1</sup> de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Luria-Bertani (10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl), NYD (10 g/L de dextrose, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de peptona), Ágar Trypan Blue sem tetraciclina (TB) (2 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g L<sup>-1</sup> de asparagina, 1 g L<sup>-1</sup> de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 g L<sup>-1</sup> de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 g L<sup>-1</sup> de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05 g L<sup>-1</sup> de azul de tripano) e Extrato de Levedura - Dextrose - Carbonato de Cálcio (YDC) (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose e 20 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio).

A avaliação foi realizada pelo método de quantificação colorimétrica marcado com cristal violeta (ANTUNES et al., 2010). Cada poço foi preenchido com 140 µL do respectivo meio de cultura, 40 µL de suspensão bacteriana e 20 µL de água destilada esterilizada. Após 36 h de incubação a 30 °C, o conteúdo de cada poço foi removido e lavado três vezes com solução salina estéril (0,9%). As células bacterianas restantes foram então fixadas por calor em uma estufa de secagem por 1 h a 60 °C. Em seguida, para corar a camada de biofilme formada, 200 µL de cristal violeta (0,5%) foram adicionados a cada poço e incubados por 15 min em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As placas foram lavadas em água corrente e o cristal violeta aderido à camada de biofilme foi solubilizado em 200 µL de etanol (99,5%) por 15 min. A quantificação do biofilme foi realizada usando um leitor de microplacas (Synergy H1 Microplate Reader, Biotek, Winooski, VT, EUA), medindo a DO<sub>570</sub>. O controle negativo consistiu de água destilada esterilizada (ADE).

A capacidade de formação de biofilme dos isolados foi determinada de acordo com

Stepanovic et al. (2000). O controle negativo (DOc) foi utilizado como base para classificar a formação de biofilme de cada isolado (DO) em diferentes meios de cultura, de acordo com os seguintes critérios:  $DO \leq DOc$  = não aderente;  $DOc \leq DO \leq (2 \times DOc)$  = formador de biofilme fraco;  $(2 \times DOc) \leq DO \leq (4 \times DOc)$  = formador moderado, e  $(4 \times DOc) \leq DO$  = formador forte. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em duplicata, contendo seis repetições de cada isolado.

### **Formação de biofilme *in vivo***

Foi avaliada a formação de biofilme em catafilos de cebola comercial inoculados com os isolados pelo método do ferimento, conforme Silva et al., (2021). Com o auxílio de um alfinete entomológico, foram feitas seis lesões nos catafilos, com aproximadamente 2,5 mm de profundidade. Em seguida, foram depositados 10 µL da suspensão bacteriana. Catafilos tratados de forma similar com água destilada esterilizada (ADE) constituíram o controle negativo. Os catafilos inoculados foram depositados em placas de Petri e colocados em bandejas plásticas contendo quatro folhas de papel absorvente embebidas em 20 mL de ADE. As bandejas foram cobertas com sacos plásticos transparentes para criar uma câmara úmida e incubadas por 48 horas a 30 °C. Fragmentos de aproximadamente 7 mm de comprimento e 4 mm de largura foram retirados da área de transição entre o tecido sadio e o adoecido. Em seguida, os fragmentos foram analisados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para a microscopia óptica, os fragmentos foram fixados em solução de FAA (formaldeído 5%, álcool etílico 5% e ácido acético 90%) por 24 horas e preservados em álcool etílico (70%) para análise histopatológica e avaliação da formação de biofilmes. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, imersos em solução de álcool etílico 100% e historesina (1:1) por 24 horas (Makuzumi et al., 2011). Posteriormente, os fragmentos foram individualmente emblocados com historesina e catalisador, de acordo com a recomendação do fabricante, e levados para estufa de secagem a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os blocos foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 5 µm. Os cortes obtidos foram depositados em lâminas de microscopia e corados com azul de toluidina (1%). As imagens foram capturadas por meio de câmera digital acoplada ao equipamento (Nikon Eclipse INU).

Para a observação por MEV, foi seguida a metodologia proposta por Fonseca et al. (2005). Os fragmentos foram mantidos a -80 °C por 24 h e depois liofilizados. Em seguida, os fragmentos foram metalizados com ouro a 10 nm em metalizador Desk V (Dentom Vacuum),

e então observados por MEV (TESCAN, VEGA 3, República Tcheca) a 15 kV. Posteriormente, as imagens digitais foram capturadas e analisadas.

### **Motilidade *swarming***

Os isolados foram analisados de acordo com a metodologia de Rashid e Kornberg (2000), com adaptações. Dez microlitros de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foram depositados no centro de placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura de motilidade (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup> e ágar 5 g L<sup>-1</sup>) e incubadas a 30°C. Após 48 horas de incubação, o diâmetro da colônia foi medido. O experimento foi realizado três vezes e conduzido em triplicata, em delineamento inteiramente casualizado.

### **Análises estatísticas**

Os dados de cada espécie foram analisados separadamente, e os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (isolados x meios de cultura). Os experimentos com réplicas que não apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as variâncias foram avaliados como repetições ao longo do tempo. Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para analisar os pressupostos da análise de variância. As médias de biofilme *in vitro* foram comparadas usando o teste da diferença mínima significativa (LSD) e a motilidade foi avaliada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas usando o software Statistix 9.0 (Tallahassee, FL, EUA). As representações gráficas foram geradas utilizando o software SigmaPlot (versão 14.0).

## **Resultados**

### **Formação de biofilme *in vitro***

Todos os isolados foram capazes de aderir à superfície inerte e formar biofilme em diferentes níveis em pelo menos um dos meios de cultura avaliados (Figura 1). O isolado de *B. sola* foi classificado como forte formador de biofilme nos meios NYD e KADO, moderado formador em YDC e fraco formador nos demais meios. Dentre os isolados de *B. semiarida*, CCRMBC33 e CCRMBC16 destacaram-se como os forte formadores de biofilme em pelo menos dois meios de cultura diferentes. Em contraste, o isolado CCRMBC171 não foi capaz de formar biofilme nos meios KADO, LB e TB, e apresentou formação predominantemente fraca nos outros meios. A formação de biofilme foi mais eficaz em meio NYD, ao passo em

que o meio TB foi o menos favorável, com a maioria dos isolados apresentando formação fraca de biofilme. A formação de biofilme para ambas as espécies também se mostrou eficaz nos meios KADO e YDC.

*B. sola* (Tabela 2) apresentou uma variação significativa ( $P < 0,05$ ) na formação de biofilme em função do meio de cultura utilizado. A interação entre os meios de cultura e os isolados de *B. semiarida* (Tabela 3), também demonstrou uma variação significativa ( $P < 0,05$ ) na formação de biofilme em função do meio de cultura utilizado e dos isolados testados. O isolado de *B. sola* (CCRMBC51), obteve melhor desempenho no meio NYD, seguido pelo meio KADO. Dentre os isolados de *B. semiarida*, os isolados CCRMBC33 e CCRMBC16 se destacaram como os maiores produtores de biofilme, diferindo significativamente dos demais isolados ( $P < 0,05$ ). O isolado CCRMBC16 apresentou também valores significativamente maiores no meio YDC. Os isolados CCRMBC74 e CCRMBC171 obtiveram, respectivamente, os menores valores de formação de biofilme (Tabela 3).

### **Formação de biofilme *in vivo***

As análises histopatológicas realizadas por microscopia óptica nos catafilos de cebola inoculados com isolados de *B. sola* e *B. semiarida* demonstraram variações no padrão de colonização e danos aos tecidos vegetais (Figura 2), quando comparados com tecidos sadios (Fig. 2a e 2b). No catáfilo inoculado com *B. sola* (CCRMBC51) (Fig 2c e 2d), foram observadas alterações estruturais significativas na estrutura dos tecidos, degradação da parede celular e sinais de colonização bacteriana no tecido parenquimatoso. A infecção por *B. semiarida* ocorreu de forma semelhante, com degradação celular evidente nos tecidos colonizados por todos os isolados (Fig. 2e a 2p). Os isolados CCRMBC17 (Fig. 2i - j), CCRMBC131 (Fig. 2k - l) e CCRMBC33 (Fig. 2m - n) promoveram uma degradação mais severa dos tecidos, resultando na desestruturação do parênquima e formação de biofilmes ao longo das paredes celulares degradadas. Em contrapartida, os isolados CCRMBC16 (Fig 2e - f), CCRMBC74 (Fig. 2g - h) e CCRMBC171 (Fig. 2o - p) foram menos agressivos e os tecidos infectados permaneceram com uma estrutura celular mais organizada, com vacúolos ainda presentes, embora com algumas deformações. A epiderme também permaneceu mais conservada e foi possível observar alguns aglomerados bacterianos nas paredes celulares e parênquima dos catafilos.

Nas análises realizadas por MEV, foi possível observar padrões distintos de colonização de biofilmes pelos isolados de *B. sola* e *B. semiarida* nos catafilos de cebola (Figura 3). *Burkholderia sola* (CCRMBC51) (Fig. 3c – 3d) formou biofilmes com estruturas

densas e bem formadas, com agregados esféricos envoltos por uma matriz polimérica (Fig. 3d). Quanto a *B. semiarida*, a formação de biofilme variou entre os isolados. O isolado CCRMBC16 formou poucas estruturas, as quais apresentaram uma conformação irregular (Fig. 3e). No entanto, esse isolado causou uma severa destruição do catafilo (Fig. 3f). Em contraste, o isolado tipo de *B. semiarida*, CCRMBC74 (Fig. 3g - 3h) apresentou uma quantidade moderada de EPS (Fig. 3g), com padrão de formação distinto em relação aos demais isolados da espécie. O biofilme formado foi mais disperso e menos denso, formando pequenos aglomerados, em formato irregular e fragmentado (Fig. 3h). Também foi possível observar bactérias planctônicas aderidas à superfície do catafilo (Fig. 3g). O isolado CCRMBC17 formou um biofilme bem estruturado, com grande quantidade de EPS e uma matriz espessa e contínua (Fig. 3i e 3j). A matriz apareceu na forma de um agregado volumoso, denso e contínuo, espesso e homogêneo (Fig. 3i), com praticamente nenhuma célula planctônica aderida à superfície do catafilo (Fig. 3j). Por sua vez, o isolado CCRMBC131, exibiu um biofilme menos densos e menos estruturados (Fig. 3k e 3l). A maioria das células bacterianas apresentaram-se dispersas, organizadas em microcolônias e não houve uma cobertura homogênea de EPS (Fig. 3k). Porém, houve a formação de uma matriz polimérica mais fina e irregular (Fig. 3l), sugerindo o início do processo de formação de biofilme e de uma matriz polimérica extracelular mais robusta. O isolado CCRMBC33 formou uma matriz de EPS bem estruturada em torno de células planctônicas (Fig. 3m). Também foi possível observar as células bacterianas se agrupando de forma mais densa, formando cadeias filamentosas em padrões geométricos, que podem refletir a fase inicial da formação do biofilme (Fig. 3n). Por fim, o isolado CCRMBC171 foi capaz de formar uma matriz de EPS bem densa e estruturada, com poucas células planctônicas na superfície (Fig. 3o). Além disso, pôde-se notar as células se organizando em pequenos agregados enfileirados (Fig. 3p).

### **Motilidade swarming**

O isolado de *B. sola* (CCRMBC51) apresentou baixa motilidade swarming, conforme demonstrado pela pequena expansão do diâmetro nas placas de Petri (Fig. 4A).

Dentre os isolados de *B. semiarida* (Fig. 4B), CCRMBC171, CCRMBC17 e CCRMBC33 apresentaram os maiores valores de motilidade, não diferindo significativamente entre si ( $P < 0,05$ ). O isolado CCRMBC16 apresentou a menor motilidade, diferindo significativamente dos demais, com um crescimento restrito ao centro da placa de Petri. Em ambas as espécies, as colônias formadas podem ser caracterizadas como circulares, planas,

com bordas variando de lisas a rugosas.

## Discussão

A capacidade de formar biofilme é um atributo de diversas bactérias, porém os mecanismos que são empregados para produção dessa estrutura podem variar de acordo com características inerentes aos isolados e fatores ambientais (Martínez; Vadyvaloo, 2014), tais como a composição do meio de cultura (Tang et al., 2012) e a disponibilidade de nutrientes (Ghosh; Barman; Mandal, 2019; Petrova; Sauer, 2012). Nesse sentido, a eficácia do meio NYD para indução a formação de biofilme *in vitro* entre os isolados pode ser atribuída à sua composição rica em nutrientes, o que favoreceu o crescimento bacteriano e a produção de biofilme. Por sua vez, no meio TB os isolados de ambas as espécies se comportaram como médio, fraco ou não formadores de biofilme. Resultados semelhantes também foram observados para isolados fitopatogênicos de *B. cenocepacia*, *B. orbicola* e *B. gladioli* pv. *alliicola*, os quais se apresentaram como médios e fracos formadores de biofilme neste meio (Silva et al., 2021). Adicionalmente, o TB caracteriza-se como um meio com menor disponibilidade de nutrientes (Louis; Siegel, 2011), indicando que a formação de biofilme *in vitro* pelas espécies estudadas é dependente da disponibilidade de nutrientes.

A formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* por isolados de bactérias pertencentes ao CBC tem sido comumente observada (Bellich et al., 2021; Caraher et al., 2007; Conway; Venu; Speert, 2002; Cunha et al., 2004; Fazli et al., 2014; Pellizzoni et al., 2016). No entanto, poucos estudos com isolados fitopatogênicos foram realizados até o presente momento (Silva et al., 2021).

Os mecanismos de patogenicidade e virulência das espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão bacteriana das escamas ainda são pouco conhecidos (Silva et al., 2018), mas há indícios de que biofilmes podem atuar como fatores de virulência durante os processos de infecção no hospedeiro (Mohan et al., 2018). Porém, estudos realizados com isolados de *B. cenocepacia*, *B. orbicola* e *B. gladioli* pv. *alliicola* em cebola indicaram que a formação de biofilme possivelmente não é um fator de virulência determinante para essas bactérias, pois não há uma correlação direta entre a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e o nível de agressividade dos isolados já estudados destas espécies (Silva et al., 2021). De forma semelhante, os resultados do presente trabalho não mostraram uma relação direta entre a formação de biofilme *in vitro* de *B. sola* e *B. semiarida* com os níveis de agressividade dos isolados estudados. Neste sentido, isolados classificados com baixa agressividade, como CCRMBC51 e CCRMBC131, apresentaram-se como fortes formadores de biofilme *in vitro* em pelo menos um meio de cultura, ao passo que isolados altamente agressivos, como

CCRMBC74 (fraco a médio formador de biofilme) e CCRMBC171 (não aderente a moderado formador de biofilme), também apresentaram variação de comportamento entre isolados agressivos e a formação de biofilme. Portanto, esses resultados sugerem que a formação de biofilme e a agressividade dos isolados não estão correlacionadas.

Nas imagens histopatológicas, tanto *B. sola* quanto *B. semiarida* foram capazes de formar biofilmes que se mantiveram aderidos principalmente ao parênquima e paredes celulares. Esse padrão de colonização se deve ao fato de que isolados fitopatogênicos de *Burkholderia* spp. ocupam espaços intercelulares, produzindo enzimas pectinolíticas liberadas pelo sistema de secreção tipo II (T2SS) (Kado, 2010).

A análise de MEV mostrou que os isolados de *B. sola* e *B. semiarida* formaram diferentes tipos morfológicos de biofilmes. Variações entre os morfotipos de biofilme de *B. orbicola*, *B. cenocepacia* e *B. gladioli* pv. *alliicola*, foram demonstrados anteriormente por Silva et al., (2021). No estudo destes autores, isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* apresentaram biofilmes mais espessos, organizados e com maior densidade celular, ao passo em que *B. gladioli* pv. *alliicola* formou biofilmes menos robustos, pouco organizados e com menor quantidade de EPS e agregados celulares (Silva et al., 2021). Tais diferenças podem estar relacionadas a variações microambientais nas diferentes áreas do tecido do hospedeiro (Toyofuku et al., 2016), bem como características intrínsecas do isolado.

A matriz de EPS confere adesão bacteriana às superfícies e proteção contra estresses, além de formar a arquitetura tridimensional do biofilme (Flemming; Wingender, 2010). Uma vez que a alta produção de EPS confere maior resistência bacteriana contra estresses ambientais e permite a manutenção da comunidade bacteriana de forma mais estável, a formação de um biofilme mais espesso e organizado como observado nos isolados CCRMBC51, CCRMBC17 e CCRMBC171 sugere uma capacidade superior de sobrevivência. Isolados com biofilme menos denso, por sua vez, como CCRMBC74, pode refletir uma estratégia de colonização diferente, como produção de enzimas extracelulares ou outros mecanismos de virulência. A formação de cadeias, como observado em CCRMBC33 e CCRMBC171, indica que as células estão se agrupando para formar uma camada mais densa para expandir o biofilme para novas áreas do tecido hospedeiro e pode ser uma estratégia para estas bactérias ocuparem novos espaços de forma mais rápida e assegurar uma maior adesão à superfície. Em CCRMBC131, embora praticamente não tenha sido observado EPS, as bactérias parecem formar pequenas colônias interconectadas, que podem significar uma fase inicial de formação do biofilme. O isolado CCRMBC16, ao contrário dos demais isolados de *B. semiarida*, praticamente não apresentou estruturas de biofilme ou células plânctônicas

(Fig. 3E), porém o tecido da cebola ficou totalmente dilacerado (Fig. 3F). Baia et al., (2021) classificaram este isolado como altamente agressivo, o que pode justificar este comportamento mais invasivo.

Em relação à motilidade *swarming*, foram observadas diferenças entre os isolados de *B. semiarida*, revelando que a característica é inerente ao isolado e não a espécie, como sugerido para *B. cenocepacia*, *B. orbicola* e *B. gladioli* pv. *alliicola* (Silva et al. 2021). Ainda assim, de maneira geral, *B. semiarida* apresentou uma motilidade significativamente maior que *B. sola*. Alguns estudos demonstram que a formação de biofilme não depende da motilidade *swarming* (Huber et al., 2001; Silva et al., 2021) e que a motilidade é regulada de forma oposta e antagônica à formação de biofilme (Kearns, 2010; Silva et al., 2021; Verstraeten et al., 2008). No presente estudo, observou-se uma relação semelhante, em que alguns isolados com maior motilidade apresentaram menor capacidade de formar biofilmes *in vitro*. Essa variação pode ter implicações diretas para a virulência e o comportamento patogênico dos isolados no hospedeiro.

Este estudo demonstrou que tanto *B. sola* quanto *B. semiarida* apresentaram capacidade significativa de formar biofilmes *in vitro* e *in vivo*, com variações notáveis entre os isolados testados. Além disso, observou-se uma relação antagônica entre a motilidade *swarming* e a formação de biofilmes, sugerindo que isolados com maior motilidade tendem a formar biofilmes menos densos.

## Referências bibliográficas

- AGODI, A.; BARCHITTA, M.; GIANNINÒ, V.; COLLURA, A.; PENSABENE, T.; GARLASCHI, M. L.; PASQUARELLA, C.; LUZZARO, F.; SINATRA, F.; MAHENTHIRALINGAM, E.; STEFANI, S. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: Identification of a cluster of epidemic lineages. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 3, p. 188–195, mar. 2002.
- BAIA, A. D. B.; SILVA, A. M. F.; RIBEIRO, B. G.; SOUZA, C. C.; SILVA JÚNIOR, W. J.; BALBINO, V. Q.; LEAL, C. M.; DE FARIAS, A. R. G.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Predominance of *Burkholderia cenocepacia* lineages causing onion sour skin in the semi-arid region of north-east Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 3, p. 521–533, 1 abr. 2021.
- BELLICH, B.; JOU, I. A.; BURIOLA, C.; RAVENSCROFT, N.; BRADY, J. W.; FAZLI, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; RIZZO, R.; CESCUTTI, P. The biofilm of *Burkholderia cenocepacia* H111 contains an exopolysaccharide composed of l-rhamnose and l-mannose: Structural characterization and molecular modelling. **Carbohydrate Research**, v. 499, p. 108231, 1 jan. 2021.
- CACIOPPO, M.; DE ZORZI, R.; SYRGIANNIS, Z.; BELLICH, B.; BERTONCIN, P.; JOU, I. A.; BRADY, J. W.; RIZZO, R.; CESCUTTI, P. Microscopy and modelling investigations on the morphology of the biofilm exopolysaccharide produced by *Burkholderia multivorans*

- strain C1576. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127294, 31 dez. 2023.
- CARAHHER, E.; REYNOLDS, G.; MURPHY, P.; MCCLEAN, S.; CALLAGHAN, M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 213–216, 1 mar. 2007.
- COENYE, T. Social Interactions in the Burkholderia Cepacia Complex: Biofilms and Quorum Sensing. **Future Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 1087–1099, 2010.
- CONWAY, B. A. D.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the Burkholderia cepacia complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678–5685, 15 out. 2002.
- CUNHA, M. V.; SOUSA, S. A.; LEITÃO, J. H.; MOREIRA, L. M.; VIDEIRA, P. A.; SÁ-CORREIA, I. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the Burkholderia cepacia complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3052–3058, jul. 2004.
- DIMAYACYAC, D. A.; BALENDRES, M. A. Pathogenicity and molecular characterization of *Burkholderia cepacia* Causing Sour Skin Disease of Onion (*Allium cepa*) Bulbs. **Manila Journal of Science**, v. 16, n. 2, p. 33–43, 2023.
- EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- FAO. **Crops and livestock products**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- FAZLI, M.; ALMBLAD, H.; RYBTKE, M. L.; GIVSKOV, M.; EBERL, L.; TOLKER-NIELSEN, T. Regulation of biofilm formation in Pseudomonas and Burkholderia species. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1961–1981, 1 jul. 2014.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. **The biofilm matrix**. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.
- GHOSH, R.; BARMAN, S.; MANDAL, N. C. Phosphate deficiency induced biofilm formation of Burkholderia on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate. **Scientific Reports** 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2 abr. 2019.
- HUBER, B.; RIEDEL, K.; HENTZER, M.; HEYDORN, A.; GOTSCHLICH, A.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; EBERL, L. The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2517–2528, 1 set. 2001.
- IBGE. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- JONES, A. M.; DODD, M. E.; GOVAN, J. R. W.; BARCUS, V.; DOHERTY, C. J.;

- MORRIS, J.; WEBB, A. K. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: Influence on survival in cystic fibrosis. **Thorax**, v. 59, n. 11, 2004.
- KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010.
- KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology** **2010 8:9**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 9 ago. 2010.
- KUANG, D.; LIU, F.; TIAN, S.; LIU, W.; LI, A.; ZHOU, Y.; HUANG, H.; XIA, Q. *Burkholderia semiarida* as Cause of Recurrent Pulmonary Infection in Immunocompetent Patient, China. **Emerging infectious diseases**, v. 30, n. 6, 1 jun. 2024.
- LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 7–12, 2011.
- MARTINA, P.; LEGUIZAMON, M.; PRIETO, C. I.; SOUSA, S. A.; MONTANARO, P.; DRAGHI, W. O.; STÄMMLER, M.; BETTIOL, M.; DE CARVALHO, C. C. C. R.; PALAU, J.; FIGOLI, C.; ALVAREZ, F.; BENETTI, S.; LEJONA, S.; VESCINA, C.; FERRERAS, J.; LASCH, P.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, A.; et al. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 1, p. 14–20, 1 jan. 2018.
- MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. MAR, p. 80693, 25 mar. 2014.
- MOHAN, R.; BENTON, M.; DANGELMAIER, E.; FU, Z.; SEKHAR, A. C. Quorum Sensing and Biofilm Formation in Pathogenic and Mutualistic Plant-Bacterial Interactions. **Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence**, p. 133–160, 28 jan. 2018.
- MORALES-RUIZ, L. M.; RODRÍGUEZ-CISNEROS, M.; KERBER-DÍAZ, J. C.; ROJAS-ROJAS, F. U.; IBARRA, J. A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia orbicola* sp. nov., a novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 3, 2022.
- OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. B.; SILVA, A. M. F.; LIMA, N. B.; LEAL, C. M.; CANDEIA, J. A.; GAMA, M. A. S. Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 6, 2019.
- PELLIZZONI, E.; RAVALICO, F.; SCAINI, D.; DELNERI, A.; RIZZO, R.; CESCUTTI, P. Biofilms produced by *Burkholderia cenocepacia*: Influence of media and solid supports on composition of matrix exopolysaccharides. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 162, n. 2, p. 283–294, 1 fev. 2016.
- PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky situations: Key components that control bacterial surface attachment. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2413–2425, maio 2012.
- RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. Socioeconomia . Em: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. (Eds.). **Cultivo da cebola no Nordeste**. Versão Eletrônica: Embrapa Semiárido-Sistema de

Produção, 2007. p. 4–8.

SFEIR, M. M. *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. **The Journal of infection**, v. 77, n. 3, p. 166–170, 1 set. 2018.

SILVA, A. M. F.; BAIA, A. D. B.; VELEZ, L. S.; OLIVEIRA, W. J.; GAMA, M. A. S. Diversidade taxonômica e patológica de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão das escamas da cebola. Em: DALIO, R. J. D. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2018. v. 26p. 81–95.

SILVA, P. H. R.; ASSUNÇÃO, E. F.; VELEZ, L. DA S.; SANTOS, L. N.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Biofilm formation by strains of *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA and IIIB and *B. gladioli* pv. *alliicola* associated with onion bacterial scale rot. **Brazilian journal of microbiology** : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 52, n. 4, p. 1665–1675, 1 dez. 2021.

SOUSA, S. A.; FELICIANO, J. R.; PITA, T.; GUERREIRO, S. I.; LEITÃO, J. H. *Burkholderia cepacia* Complex Regulation of Virulence Gene Expression: A Review. **Genes** **2017, Vol. 8, Page 43**, v. 8, n. 1, p. 43, 19 jan. 2017.

TANG, J.; CHEN, J.; LIU, J.; ZHANG, R.; YANG, R.; CHEN, L. EFFECTS OF DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS BIOFILM FORMATION AND DIVERSITY OF ADHESIN GENES. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 2, p. 210–218, 1 maio 2012.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAWATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7–12, 2 jan. 2016.

VELEZ, L. S.; ABURJAILE, F. F.; FARIAS, A. R. G.; BAIA, A. D. B.; OLIVEIRA, W. J.; SILVA, A. M. F.; BENKO-ISEPPON, A. M.; AZEVEDO, V.; BRENIG, B.; HAM, J. H.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, 1 maio 2023.

VERSTRAETEN, N.; BRAEKEN, K.; DEBKUMARI, B.; FAUVART, M.; FRANSAER, J.; VERMANT, J.; MICHELIS, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 496–506, 1 out. 2008.

WALLNER, A.; KING, E.; NGONKEU, E. L. M.; MOULIN, L.; BÉNA, G. Genomic analyses of *Burkholderia cenocepacia* reveal multiple species with differential host-Adaptation to plants and humans. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 2019.

WORDELL-FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. Em: WORDELL-FILHO, J. A. et al. (Eds.). **Manejo Fitossanitário na cultura da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 19–162.

WORDELL-FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Bacterioses da cebola: diagnose e recomendações para o controle integrado. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n. 3, p. 45–47, 2007.

570 Tabela 1: Isolados de *B. sola* e *B. semiarida* utilizados neste estudo

| Isolado   | Espécie             | Local de coleta            | Agressividade <sup>1</sup> |
|-----------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| CCRMBC51  | <i>B. sola</i>      | Casa Nova, BA              | Baixa                      |
| CCRMBC16  | <i>B. semiarida</i> | Petrolândia, PE            | Alta                       |
| CCRMBC17  | <i>B. semiarida</i> | Belém de São Francisco, PE | Baixa                      |
| CCRMBC33  | <i>B. semiarida</i> | Belém de São Francisco, PE | Alta                       |
| CCRMBC74  | <i>B. semiarida</i> | Belém de São Francisco, PE | Alta                       |
| CCRMBC131 | <i>B. semiarida</i> | Sento Sé, BA               | Baixa                      |
| CCRMBC171 | <i>B. semiarida</i> | Belém de São Francisco, PE | Alta                       |

571 <sup>1</sup> Agressividade a bulbos de cebola, conforme classificação de Baia et al. (2021).

572

573 Tabela 2: Interação entre meios de cultura na formação de biofilme por *B.sola*.

| Meios de cultura | Isolado  |
|------------------|----------|
|                  | CCRMBC51 |
| KADO             | 0,499 a  |
| LB               | 0,150 c  |
| NYD              | 0,844 a  |
| TB               | 0,119 c  |
| YDC              | 0,288 b  |

574 Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem significativamente  
575 entre si pelo teste LSD de Fisher ( $p>0,05$ ). CV(%) = 36.92.

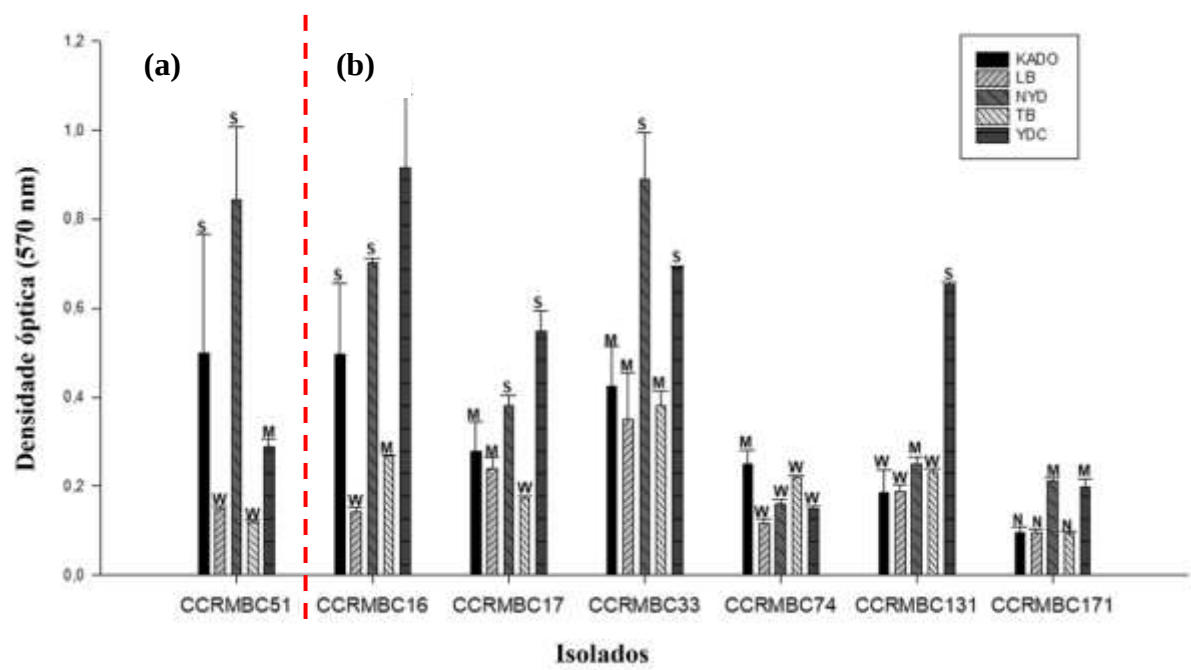
576

577 Tabela 3: Interação entre meios de cultura e isolados de *B.semiarida* na formação de biofilme.

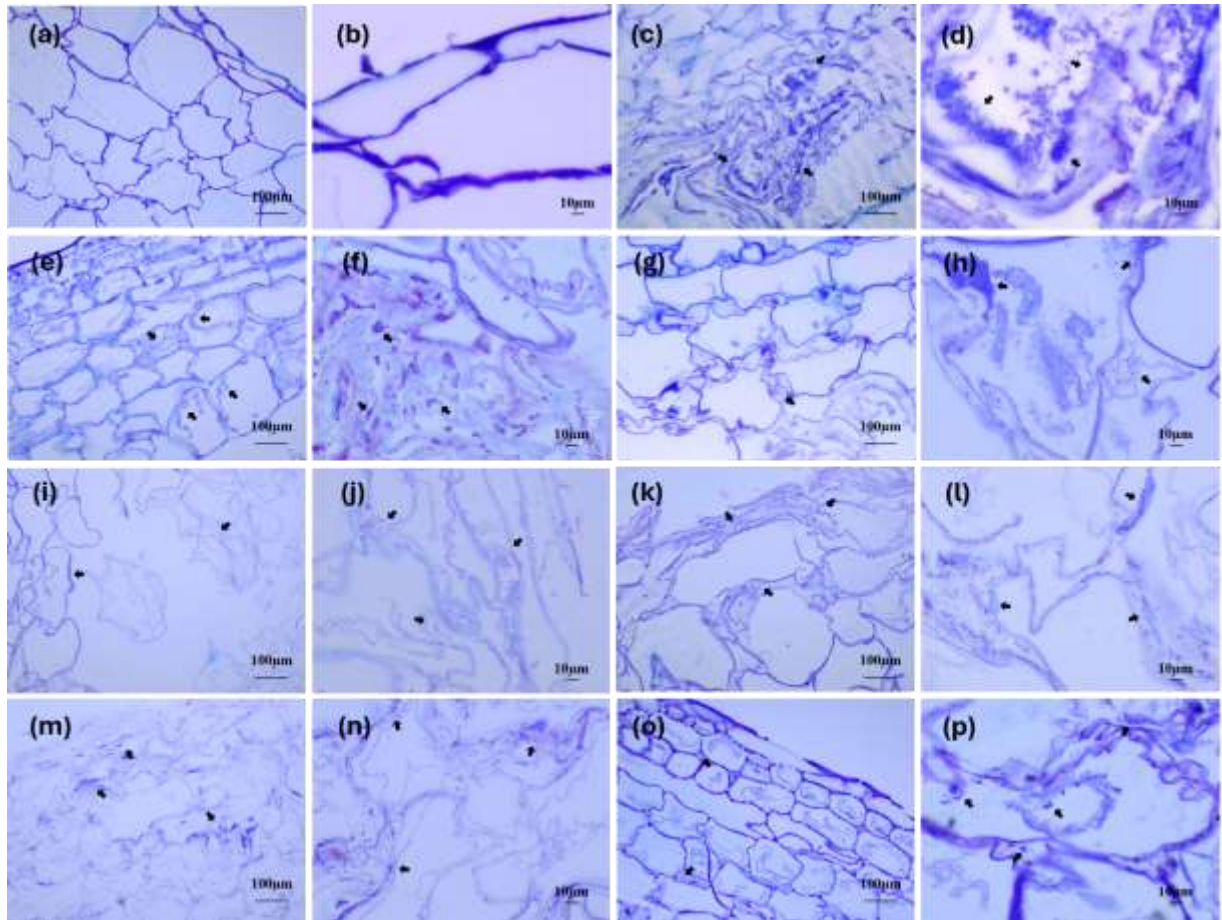
| Meios<br>de<br>cultura | Isolados     |              |              |              |               |               |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
|                        | CCRMBC<br>16 | CCRMBC<br>17 | CCRMBC<br>33 | CCRMBC<br>74 | CCRMBC<br>131 | CCRMBC<br>171 |
| KADO                   | 0,496 cA     | 0,278 bB     | 0,424 cA     | 0,250 aB     | 0,187 bB      | 0,097 aC      |
| LB                     | 0,143 dB     | 0,240 bB     | 0,349 cA     | 0,116 aC     | 0,188 bB      | 0,097 aC      |
| NYD                    | 0,703 bB     | 0,380 bC     | 0,888 aA     | 0,160 aD     | 0,251 bD      | 0,213 aD      |
| TB                     | 0,268 dB     | 0,172 bB     | 0,380 cA     | 0,219 aB     | 0,231 bB      | 0,095 aC      |
| YDC                    | 0,914 aA     | 0,550 aC     | 0,690 bB     | 0,149 aD     | 0,652 aB      | 0,199 aD      |

578 Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem  
579 significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ( $p>0,05$ ). CV(%) = 15,47.

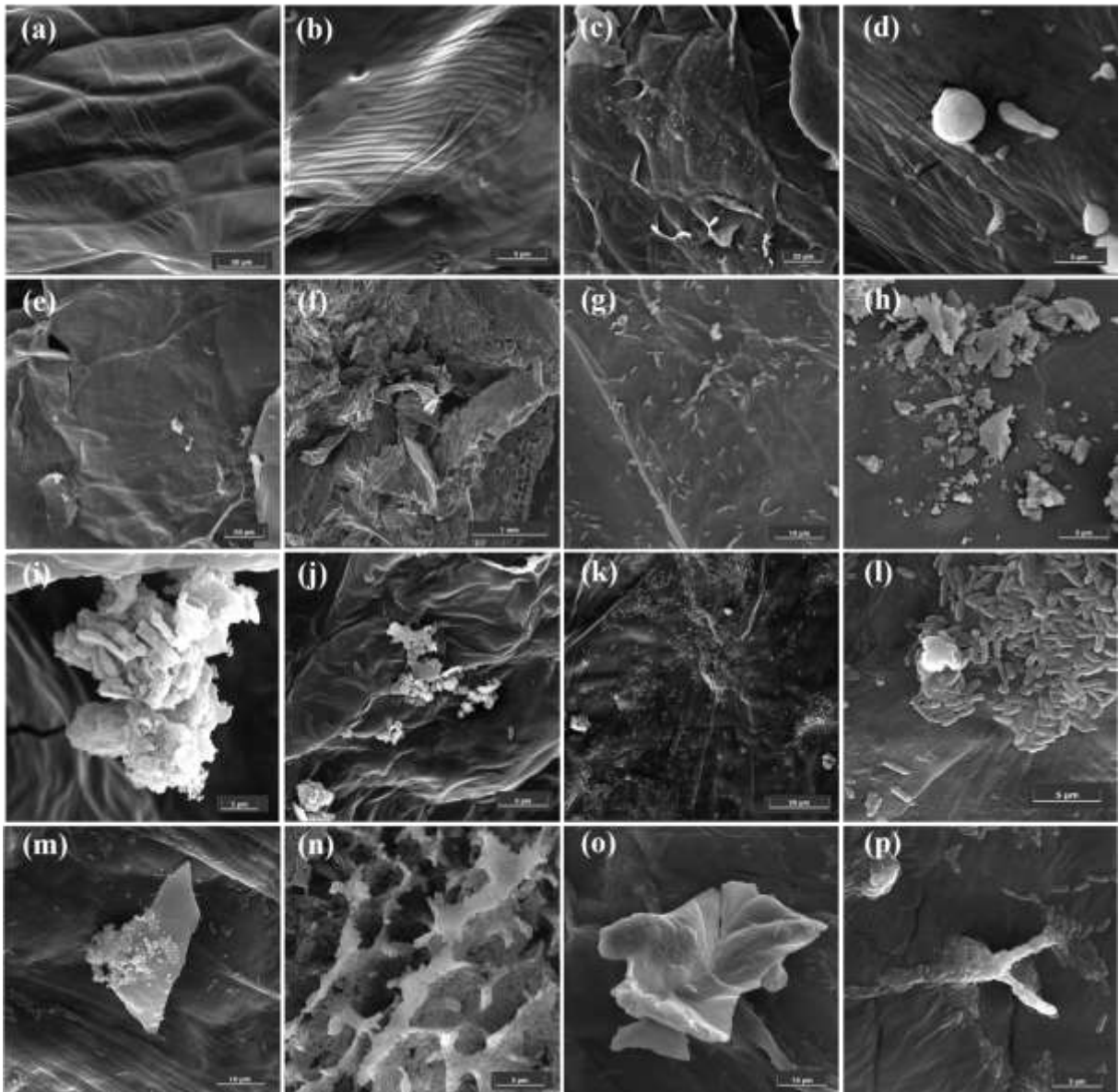
580



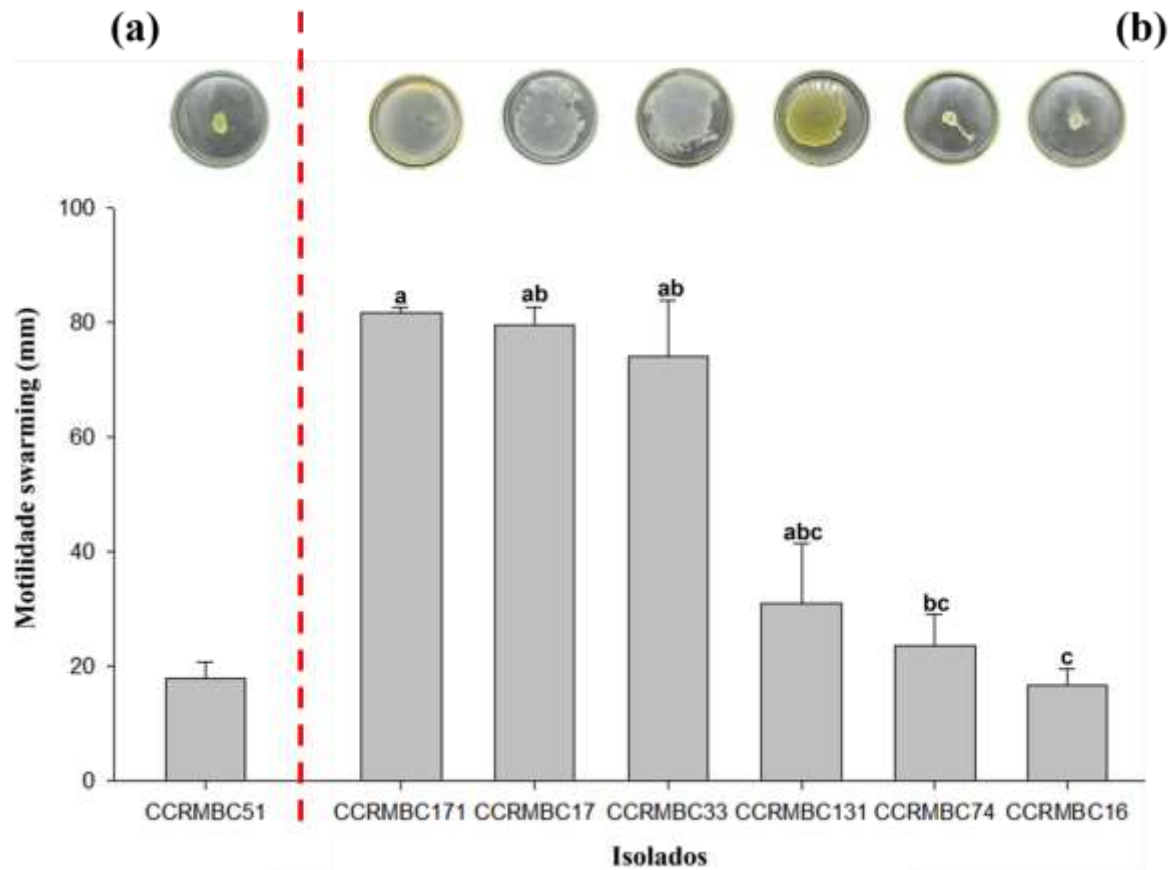
**Figura 3:** Capacidade de formação de biofilme por *Burkholderia sola* (CCRMBC51) (a) e diferentes isolados de *B. semiarida* (CCRMBC16, CCRMBC17, CCRBMA33, CCRMBC74, CCRMBC131, CCRMBC171) (b), em diferentes meios de cultura: KADO (Kado 523), LB (Lúria-Bertani), NYD (nutrient-dextrose-yeast extract), TB (trypan blue sem tetraciclina), YDC (yeast extract-dextrose-calcium carbonate). As colunas representam a média de formação de biofilme. A barra de erro representa o desvio padrão. N = não aderente (non-adherent); W = fraco formador de biofilme (weak); M = moderado formador de biofilme (moderate); S = forte formador de biofilme (stronger).



**Figura 2:** Imagens histológicas de catafilos de cebola colonizados por *B. sola* e *B. semiarida* em microscópio óptico. (a, b) Testemunha negativa com ADE (10x, 40x); (c, d) *B. sola* CCRMBC51 (10x, 40x); (e – p) *B. semiarida*: (e, f) CCRMBC16 (10x, 40x); (g, h) CCRMBC74 (10x, 40x); (i, j) CCRMBC17 (10x, 40x); (k, l) CCRMBC131 (10x, 40x); (m, n) CCRMBC33 (10x, 40x); (o, p) CCRMBC171 (10x, 40x).



**Figura 3:** Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de formação de biofilme por *B. sola* e *B. semiarida* em catafilos de cebola. (a, b) Testemunha negativa inoculada com ADE (1000x, 10000x); (c, d) *B. sola* CCRMBC51 (2000x, 10000x); (e–p) *B. semiarida*: (e, f) CCRMBC16 (2000x, 77x); (g, h) CCRMBC74 (5000x, 10000x); (i, j) CCRMBC17 (10000x, 18400x); (k, l) CCRMBC131 (3000x, 10000x); (m, n) CCRMBC33 (5000x, 10000x); (o, p) CCRMBC171 (5000x, 10000x).



**Figura 4:** (a) Motilidade *swarming* de *B. solana* (CCRMBC51); (b) motilidade *swarming* de *B. semiarida* (CCRMBC171, CCRMBC17, CCRMBC33, CCRMBC131, CCRMBC74, CCRMBC16). As colunas indicam o diâmetro médio obtido a partir de nove réplicas de três experimentos independentes. A barra representa o desvio padrão. Barras indicadas com letras diferentes não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES GERAIS

- A genotipagem por BOX-PCR é eficiente para detectar diversidade entre isolados de *Burkholderia spp.*;
- O sequenciamento da região 16S rDNA pode ser utilizado na identificação de isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia* e à *B. gladioli*;
- Com a análise do gene *recA* é possível agrupar espécies do CBC de maneira eficaz.
- Existe uma variabilidade patogênica significativa, entre isolados de *B. sola* e *B. semiarida*;
- Os isolados de *B. sola* e *B. semiarida* demonstraram capacidade considerável de formar biofilmes *in vitro* e *in vivo*;
- Os biofilmes formados por *B. sola* e *B. semiarida* colonizam principalmente as paredes celulares e o parênquima dos tecidos de cebola;
- Existem diferenças morfológicas nos biofilmes entre os isolados, alguns formam biofilmes robustos e bem organizados, enquanto outros apresentaram estruturas menos densas e dispersas;
- Entre alguns dos isolados estudados existe uma relação inversa entre a formação de biofilme e a motilidade swarming, com isolados que formaram biofilmes mais densos apresentando menor motilidade e vice-versa.